



<p>(51) 国際特許分類6 G01N 33/543</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/40740</p> <p>(43) 国際公開日 1998年9月17日(17.09.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/00857</p> <p>(22) 国際出願日 1998年3月2日(02.03.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/72649 1997年3月10日(10.03.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日水製薬株式会社 (NISSUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒170-0002 東京都豊島区巣鴨二丁目11番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 奥 裕一 (OKU, Yuichi)(JP/JP) 田中良樹 (TANAKA, Yoshitatsu)(JP/JP) 大塚洋子 (OTSUKA, Yoko)(JP/JP) 〒307-0036 茨城県結城市北南茂呂1075-2 日水製薬株式会社 研究本部内 Ibaraki, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 光来出良彦 (MITSUKUDE, Yoshihiko) 〒101-0063 東京都千代田区神田淡路町2-1 T金井ビル Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 CA, IL, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: ANALYTICAL METHOD, KIT, AND APPARATUS</p> <p>(54) 発明の名称 分析方法、キット及び装置</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Analytical method, kit, and apparatus which, in one analytical apparatus, can simultaneously judge the presence or absence of at least one biological substance with higher sensitivity or can determine the amount of the at least one biological substance. A reagent containing at least one marker-labeled ligand and at least one nucleic acid-labeled ligand is brought into contact with a liquid sampled containing at least one analyte to form at least one complex. The resultant at least one composite is developed in a developing element sheet (11) by a capillary phenomenon. Anti-binders, for which detection zones (15, 16, 17) are formed for each of at least one nucleic acid immobilized onto the detection zone (14), are captured by complementary binding of the nucleic acid. The composite is captured for each of the analyte by complementary binding between the anti-binder and the binder to form separate bands, thereby assaying the amount or presence of the detection site.</p> <div data-bbox="695 1224 1385 1602"> <p>The diagram illustrates the analytical apparatus. It shows a horizontal base (1) with three detection zones (14) labeled A, B, and C. Each zone contains a nucleic acid-labeled ligand (ON1, ON2, ON3) and an anti-binder (αA, αB, αC). The anti-binders are shown as Y-shaped structures with marker-labeled ligands (M) and nucleic acid-labeled ligands (ON1', ON2', ON3'). The antigens (A, B, C) are shown as circles with the letters A, B, and C inside. The antigens are shown binding to the anti-binders. The detection zones are numbered 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7. The antigens are labeled αA, αB, αC. The nucleic acid-labeled ligands are labeled ON1, ON2, ON3. The anti-binders are labeled αA, αB, αC. The marker-labeled ligands are labeled M. The detection zones are numbered 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7.</p> </div> <div data-bbox="768 1623 1304 1770"> <p>A ... Antigen A      (A) : 抗原 A</p> <p>B ... Antigen B      (B) : 抗原 B</p> <p>C ... Antigen C      (C) : 抗原 C</p> </div>		

(57) 要約

1 種類以上の生物学的物質を一つの分析装置において、より高感度に、同時にその有無の判定、或いはその量の測定を可能にする分析方法、そのキット及び装置を提供する。1 種類以上のマーカー標識化配位子と、1 種類以上の核酸標識化配位子を含む試薬と、1 種類以上の分析物を含む液体試料を接触させて1 種類以上の複合体を形成させ、形成された1 種類以上の複合体を、シート状の展開要素 11 中に毛管現象により展開させ、検出ゾーン 14 に固定化された核酸からなる1 種類以上の種類毎に検出ゾーン 15, 16, 17 が形成された抗結合子に対して、核酸の相補的結合により捕獲し、前記抗結合子-結合子間の相補的結合により分析物の種類毎に複合体を捕獲して各々独立した帯を形成させ、検出部位の量又はその存在を検定する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AT	オーストリア	GB	ガボン	LV	ラトヴィア	TD	チャド
AU	オーストラリア	GE	英国	MC	モナコ	TG	トーゴ
AZ	アゼルバイジャン	GH	グルジア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GN	ガンビア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BB	バルバドス	GR	ギリシア	ML	マリ	TR	トルコ
BE	ベルギー	GW	ギニア・ビサウ	MR	モリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
BG	ブルガリア	IE	アイルランド	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BJ	ベナン	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
BR	ブラジル	IS	アイスランド	NE	ニジェール	US	米国
BY	ベラルーシ	IT	イタリア	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CA	カナダ	JP	日本	NO	ノルウェー	VN	ベトナム
CF	中央アフリカ共和国	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	YU	ユーゴスラビア
CG	コンゴ共和国	KR	韓国	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CH	スイス	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
CI	コートジボワール	KZ	カザフスタン	RO	ルーマニア		
CM	カメルーン	LA	ラオス	RU	ロシア		
CN	中国	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
CO	コロンビア	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
CY	キプロス	LK	スリランカ	SI	スロベニア		
CZ	チェコ	LR	リベリア	SK	スロヴァキア		
DE	ドイツ	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ		
DK	デンマーク						
EE	エストニア						
ES	スペイン						

## 明 細 書

## 分析方法、キット及び装置

## 技術分野

- 5 本発明は、生物学的物質を分析の対象とした分析物の量の測定、あるいは有無を検定するための簡易臨床診断に有用な分析方法、該方法に使用するキット及び装置に関し、特に、液体試料に含まれる一種類以上の分析物の量或いは有無を一度に膨大な組合せが実現できる分析方法、該方法に使用するキット及び装置に関する。

10

## 背景技術

- 臨床検査において患者の罹患している疾病を決定する際には、数種の検査結果を総合して判断することが行われている。患者は的確な診断と治療を受けるために数種類の検査を受けることが一般的である。しかしながら、従来の技術では1種類の臨床診断試薬で1種類
- 15 種類の項目しか測定、あるいは検出することができない場合がほとんどであるために、検査数に比例して患者から採取される検体量は増加し、患者の身体的な負担の一つとなっている。

- 一方、従来の免疫学的な検査を行う場合、通常、自動装置などを用いて検査を行う必要があるために、採取された患者の検体は自動分析装置のある施設に運搬され、そこで検査が行われ、得られた結果が医師に伝えられ、そのようにして結果と患者の臨床的な症状により診断が行われている。そのため、医師がすぐに診断を下すことができずに治療のタイミングを逸する原因の一つとなっていた。

- 20 近年、こうした問題を解決できるように、免疫反応とクロマトグラフィーを組み合わせた方法（以下、イムノクロマト法と略記する。）が開発された。従来のイムノクロマト法の標準的な原理を次に

説明する。

従来のイムノクロマト法に使用される分析装置は、ニトロセルロース膜などの多孔質性でシート状の展開要素の一端に、分析物を含む液体試料を適用するための適用ゾーンが設けられ、他方端に展開要素を毛管現象により移動してきた液体を受入れるための吸水ゾーンが設けられ、それらの間で適用ゾーンに近い側にマーカー標識化免疫物質が含まれている封入ゾーンが配置され、適用ゾーンに遠い側に、分析物と標識化物からなる複合体を結合するための免疫物質が固定された検出ゾーンが配置されたものである。

- 10      このような分析装置を用いた分析方法は、まず測定すべき分析物を含む液体試料が、適用ゾーンに適用されると、液体試料は毛管現象により、マーカー標識化免疫物質が含まれる封入ゾーンに移動する。該封入ゾーンにおいて、マーカー標識化免疫物質と分析物が免疫学的親和性により結合し、マーカー標識化免疫複合体が形成される。
- 15      該マーカー標識化免疫複合体は、毛管現象及び／又は拡散により、展開要素を展開移動して検出ゾーンに達し、該検出ゾーンに固定化されている免疫物質によって捕獲される。該検出ゾーンで捕獲されたマーカー標識化免疫複合体中のマーカーについて測定あるいは検出することによって、液体試料中に含まれている分析物の量の
- 20      測定あるいはその存在を検定することができる。

- この方法は、免疫化学的活性物質の測定検出のひとつである酵素免疫測定法などに比べ、測定途中で洗浄操作が不要で、また目視により検定が可能であるのでマーカーを検出するための測定装置も特に必須ではなく、さらに分析装置に含まれる試薬が乾燥状態で保たれるために室温で長期保存が可能という点に特徴を有する。このよ
- 25      うな従来のイムノクロマト法によれば、医師が採取した検体を直ちに医師自身が検査することができるので、患者の臨床的な症状と免

疫学的な検査結果を総合して医師が短時間で診断をくだすことができ、そのため、治療のタイミングを逸してしまうことは少なくなるという利点がある。

5 イムノクロマト法に関してはいくつかの特許が公開されている。  
例えば、特公平7-13640号公報に記載のイムノクロマト法は、  
前述の従来のイムノクロマト法と基本的に同一であり、不溶性小  
胞マーカーに結合したリガンドを使用し、且つ該不溶性小胞マーカーが、着色リポソーム、着色重合体ビーズ、金属又は重合体染料粒子である点に特徴を有する。しかしながら、該公報には同時に1種  
10 以上の抗原あるいは抗体等の生物学的物質の定量あるいは検出については何も示唆されていない。

また、特許第2504923号明細書に記載のイムノクロマト法は、前述の従来のイムノクロマト法と基本的に同一であり、検出ゾーンで捕獲される複合体がマーカー標識化受容体-分析物-受容体  
15 からなる、いわゆるサンドイッチアッセイ法による分析や、生物学的親和特性の異なる第1被分析物と第2被分析物の同時検出の示唆がなされている。しかしながら、該公報には、マーカー標識化免疫複合体が核酸塩基の相補的な結合により検出ゾーンにおいて捕獲されることについて、また被分析物の種類が2個よりも多い場合の適用性及びその場合の測定感度については何も示唆されていない。  
20

一方、免疫学的分析法において、多くの免疫化学的活性物質を固相化できる方が、より高感度化が図れ、おなじ量の免疫化学的活性物質を短時間で検出できる。そのために、イムノクロマト法においてもより高感度な分析技術の出現が望まれてきた。

25 そこで、本発明の目的は、1種類以上の生物学的物質を一つの分析装置において、より高感度に、同時にその有無の判定、或いはその量の測定を簡易な手段で可能にする臨床診断に有用な分析方法、

その分析に使用されるキット及び装置を提供することである。

### 発明の開示

本発明の分析方法の一つの態様は試薬と分析装置が別体となっているキットを使用する分析方法である。該分析方法は、液体試料中に存在する 1 種類以上の分析物の量を測定あるいは有無を検定する分析方法であって、（１）第一配位子にマーカが結合されてなる 1 種類以上のマーカ標識化配位子を含み、且つ第二配位子に分析物の種類に応じて予め決定された塩基配列を有する核酸である結合子が結合されてなる 1 種類以上の結合子標識化配位子を含む試薬と、1 種類以上の分析物を含む液体試料を接触させて、特定の種類の分析物、該分析物に対して特異的に結合する特定の種類のマーカ標識化配位子、及び該分析物に対して特異的に結合する特定の種類の結合子標識化配位子からなる特定の種類の複合体を 1 種類以上形成させること、（２）形成された 1 種類以上の複合体を、シート状の展開要素中に毛管現象により展開させること、（３）前記複合体中の結合子に対して相補的な塩基配列を有する核酸からなる抗結合子が種類毎に独立して前記展開要素上に固定されてなる検出ゾーンにおいて、前記結合子と前記抗結合子間の相補的結合により分析物の種類毎に複合体を捕獲して各々独立した帯を形成させること、（４）前記検出ゾーンで形成された帯に含まれるマーカを測定又は検定することを含むことからなる。

本発明の分析方法の別の態様は試薬が一体となって含まれている分析装置を使用する方法である。該分析方法は、液体試料中に存在する 1 種類以上の分析物の量を測定あるいは有無を検定する分析方法であって、（１）1 種類以上の分析物を含む液体試料をシート状の展開要素に適用して、展開要素中を毛管現象により展開させるこ

と、（２）分析物の特定の種類に対して特異的に反応することができる第一配位子にマーカーが結合されてなる１種類以上のマーカー標識化配位子、及び分析物の特定の種類に対して特異的に反応することができる第二配位子に分析物の種類に応じて予め決定された塩基配列を有する核酸である結合子が結合されてなる１種類以上の結合子標識化配位子を含む試薬成分が封入されている封入ゾーンに前記液体試料を移動させ接触させること、（３）前記試薬と液体試料との接触により形成された、特定の種類の分析物、該分析物に対して特異的に結合する特定の種類のマーカー標識化配位子、及び該分析物に対して特異的に結合する特定の種類の結合子標識化配位子からなる特定の種類の複合体の１種類以上、或いは形成されつつある反応物を毛管現象により該展開要素中に展開させること、（４）前記複合体中の結合子に対して相補的な塩基配列を有する核酸からなる抗結合子が種類毎に独立して前記展開要素上に固定されてなる検出ゾーンにおいて、前記結合子と前記抗結合子間の相補的結合により分析物の種類毎に複合体を捕獲して各々独立した帯を形成させること、（５）前記検出ゾーンで形成された帯に含まれるマーカーを測定又は検定することを含むことからなる。

また、本発明の分析キットは、試料中に存在する１種類以上の分析物の量の測定或いは有無を検定するための分析キットであって、該分析キットは、下記の試薬、及び該試薬とは別体の分析装置から構成される。即ち、本発明の分析キットにおいて、試薬は、分析物の特定の種類に対して特異的に反応することができる第一配位子にマーカーが結合されてなる１種類以上のマーカー標識化配位子、及び分析物の特定の種類に対して特異的に反応することができる第二配位子に分析物の種類に応じて予め決定された塩基配列を有する核酸からなる結合子が結合されてなる１種類以上の結合子標識化配位

子を含む試薬である。前記分析装置は、シート状の展開要素を有し、該展開要素は毛管現象により、分析物、試薬、及び分析物と試薬の結合物を展開でき、前記別体の試薬に含まれる結合子に対して相補的な塩基配列を有する核酸からなる 1 種類以上の抗結合子が、種類毎に独立して該展開要素の検出ゾーンに固定されてなるものであり、分析物が含まれる液体試料と前記試料との混合物が適用された場合、検出ゾーンにおいて、結合子と抗結合子間の相補的結合により分析物の種類毎に複合体を捕獲して各々独立した帯を形成させることができる。

10      また、本発明の分析装置は、前記分析キットに含まれる、分析装置であることを特徴とする。

15      また、本発明の分析装置は、試料中に存在する 1 種類以上の分析物の量の測定或いは有無を検定するための分析装置であって、該分析装置は、(1) 毛管現象により、分析物、試薬、及び分析物と試薬の結合物を展開できるシート状の展開要素、(2) 前記シート状の展開要素の一端に位置し、液体試料を外部から受入れ可能で、受入れた液体試料を他方端に達するのに十分な供給能力を持ち、後記する試薬が封入された封入ゾーンに対して分析すべき液体試料を供給することが可能で、該液体試料を外部から受け入れるための適用ゾーン、(3) 分析物の特定の種類に対して特異的に反応することができる第一配位子にマーカーが結合されてなる 1 種類以上のマーカー標識化配位子、及び分析物の特定の種類に対して特異的に反応することができる第二配位子に分析物の種類に応じて予め決定された塩基配列を有する核酸からなる結合子が結合されてなる 1 種類以上の結合子標識化配位子を含む試薬が含まれている前記展開要素の前記適用ゾーンに近い位置に配置された封入ゾーン、(4) 前記展開要素中を拡散してきた分析物、試薬、及び分析物と試薬の結合物



を受け入れることができ、且つ前記適用ゾーンとは離れた位置に配置された吸水ゾーン、（５）前記封入ゾーンと前記吸水ゾーンとの間に位置し、前記結合子に対して相補的な塩基配列を有する抗結合子が１種類以上独立して固定されており、分析物の種類毎にマーカー標識化配位子、分析物、及び結合子標識化配位子から形成された複合体を捕捉して検出できる検出ゾーンを含むことを特徴とする。

本発明によれば、１種類以上の分析物の分析が単一のキット或いは装置で、高感度に測定することが可能となる。

本発明において「配位子」とは、分析物に対して生物学的親和性を有し、分析物の特定の種類に対して特異的に反応することができ、結合してペアを形成することができる一方の分子である。本発明において「第一配位子」及び「第二配位子」とは、同一の性質を有するものであっても、異なってもよい。また、分析物が抗原である場合、第一配位子、第二の配位子は抗体とすることができ、分析物が抗体である場合は、第一配位子、第二の配位子は抗原とすることができる。また、分析物と配位子との組合せの他の例には、受容体とこれに結合するリガンドとの組合せ、核酸とこれに結合する相補的な核酸との組合せ、レクチンとこれに結合する特異的な糖との組合せも包含される。

本発明において「結合子」とは、分析物とは結合せず、配位子とは異なる反応性を有する核酸である。本発明において「抗結合子」とは、「結合子」の塩基配列に少なくとも部分的に相補的な塩基配列を有する核酸であり、結合子と相補的に結合する。「結合子」と「抗結合子」との結合の組合せは、結合子及び抗結合子を構成する核酸分子の塩基配列によって無限といえる程の膨大な組合せが可能となる。結合子と抗結合子の相補的結合の観点から、各々の塩基配列が部分的に相補的に対応しているものでもよく、また互いの相補

的塩基配列が完全に一致しているものでも良い。結合子、抗結合子となる核酸には、具体的にはDNA、RNA、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドが使用でき、好ましくは10mer 以上100mer以下の長さのオリゴヌクレオチドが好ましい。

5 検出ゾーンにおいて抗結合子は展開要素に直接的或いは他の物質を介して間接的に結合して固定されている。例えば、核酸の5'又は3'末端、或いは核酸を構成する塩基に導入された官能基を介して、展開要素として不溶性支持体に含まれる官能基と、抗結合子である核酸を共有結合させることにより展開要素に直接的に固定することができる。抗結合子は分析すべき1種類以上の分析物の種類に  
10 応じてそれぞれ異なる塩基配列が予め決定されており、展開要素の検出ゾーンに種類毎に独立してゾーンをなして固定されている。

核酸の5'又は3'末端基に導入されたビオチン、或いは核酸を構成する塩基に導入されたビオチンを介して、展開要素として不溶性支持体に予め結合させたアビジン或いはストレプトアビジンと結合させることにより、抗結合子である核酸を展開要素に間接的に固定  
15 することができる。また、核酸の5'又は3'末端、或いは核酸を構成する塩基に導入された官能基を介して、核酸をタンパク質に結合させ、この核酸結合タンパク質を展開要素としての不溶性支持体に結合させることにより、抗結合子である核酸を間接的に展開要素に固定することができる。  
20

本発明において使用される試薬成分には、第一配位子にマーカ  
25 ーが結合されてなる「マーカー標識化配位子」、及び第二配位子に分析物の種類に応じて予め決定された塩基配列を有する核酸である結合子が結合されてなる「結合子標識化配位子」が使用される。試薬成分は、展開要素と別体となつて、展開要素と組合せ使用されるべきキットを構成することができる。また、試薬成分は、展開要素の

封入ゾーンに乾燥した状態で保持されていてもよい。

5 マーカー標識化配位子に含まれるマーカーには、具体的には酵素学的に活性な分子、ジゴキシゲニン、金属コロイド、着色ラテックス、着色リポソーム、核酸、ビオチン、アビジン、蛍光物質、発光物質、放射性同位元素などを使用することができる。なお、着色とは肉眼的に識別できる色を付着させることに限らず、蛍光物質、発光物質を付着させることも包含する。

10 本発明において「展開要素」は、シート状をなしており、毛管現象により、分析物、試薬、及び分析物と試薬の結合物をクロマトグラフ的に展開できる。好適な展開要素には、多孔質不溶性支持体を使用でき、具体的にはプラスチック製多孔質支持体、セルロース系多孔質支持体、無機系多孔質支持体を使用でき、さらに具体的には、多孔質の、セルロース、ニトロセルロース、酢酸セルロース、ナイロン、シリカ、またはこれらの誘導体などが挙げられ、展開要素  
15 に形成された複数のゾーン毎に材料を変えたり、組み合わせて使用することができる。場合によっては、複数のゾーンは一方の面を、同一の素材あるいは異なる素材によって補強されている場合もある。また、これらのゾーンは、分析が行なわれないときは通常、乾燥して存在する。

20

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、分析物が 1 種類以上を対象とした本発明の分析キットの構成要素の一方である試薬の一例を模式的に示す。

25 図 2 は、本発明の分析キットの構成要素の他方である分析装置の一例を模式的に示す。

図 3 は、図 1 及び図 2 に示される分析キットを用いた簡易臨床診断方法により、マーカー標識化免疫複合体が分析物の種類毎に捕獲

された様子を模式的に示す。

図 4 は、本発明の分析装置の別の態様を示し、試薬が装置の中に乾燥状態で一体となって含まれている分析装置である。

5 図 5 は、図 4 の分析装置の使用例として、目的とする分析物を抗原 A、抗原 B、抗体 C とする場合に、分析装置の封入ゾーン 18 に乾燥状態で含まれている試薬の構成を示す。

図 6 は、図 4 に示される分析装置を用いた簡易臨床診断方法により、マーカー標識化免疫複合体が分析物の種類毎に捕獲された様子を模式的に示す。

10 図 7 は、分析物が核酸である場合において、本発明に従って、検出ゾーンで核酸が捕獲される原理を示し、分析物はオリゴヌクレオチド ON3 とオリゴヌクレオチド ON2 をその配列中に含む核酸である。

15 図 8 は、分析物が抗原であり、抗原を検出するための分析装置として、検出ゾーンにおいて、IgG 抗体に抗結合子として核酸が導入された核酸標識化 IgG 抗体が不溶性担体に固定されている場合を示す。

図 9 は、図 8 に示す検出ゾーンにおいて、サンドイッチ免疫複合体が捕獲された状態を示す。

20 図 10 は、アビジンを物理吸着により検出ゾーンに固相化してなるア固相化アビジンに対して、核酸にビオチンを導入してなるビオチン化核酸を結合させることにより、核酸をビオチン－アビジンの反応により固相化したものである。

25 図 11 は、図 10 に示すビオチン－アビジンの反応により固相化した核酸とは別の態様の固相化核酸を示し、図 10 に示す核酸－ビオチン－アビジン複合体にさらに、核酸－ビオチン－アビジン複合体を核酸の相補的結合により結合させて核酸を固相化したものである。

る。

図 1 2 は、本発明の分析装置としてのテストストリップをケースに収容する手段を示す。

図 1 3 は、実施例 5 で使用したストリップ状の分析装置を示す。

5 図 1 4 は、実施例 8 に使用した分析装置を示し、その分析装置の長手方向切断面である。

図 1 5 は、実施例 8 に使用した分析装置を示し、その分析装置の側面面である。

10 図 1 6 は、実施例 8 に使用した分析装置を示し、その分析装置の上面図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

図 1 は、分析物が 1 種類以上を対象とした本発明の分析キットの構成要素の一方である試薬の一例を模式的に示し、目的とする分析物  
15 物が 3 種類の抗原、即ち、抗原 A、抗原 B、抗原 C の場合である。

図 1 において、枠で囲ってある部分は全て一つの試薬中に含まれる成分であり、該試薬は乾燥状態でも、液体中に存在していてもよい。図 1 中、 $\alpha A$ 、 $\alpha B$ 、 $\alpha C$  は、各々抗原 A、抗原 B、抗原 C に対する抗体を示す。この抗体  $\alpha A$ 、抗体  $\alpha B$ 、抗体  $\alpha C$  には各々マ  
20 ーカーが結合されて、マーカー標識化抗体となっている。各抗体に導入されるマーカーは同一のものであっても、異なるものであってもよい。この試薬中には、さらに抗体  $\alpha A$ 、抗体  $\alpha B$ 、抗体  $\alpha C$  に各々異なる配列の、オリゴヌクレオチド ON1、オリゴヌクレオチド ON2、オリゴヌクレオチド ON3 が結合された 3 種類の抗体-オリ  
25 ゴヌクレオチド結合体が前記 3 種類のマーカー標識化抗体と同時に含まれている。分析キットを構成する試薬は液状であっても、乾燥状態であってもよい。

図 2 は、本発明の分析キットの構成要素の他方である分析装置の一例を模式的に示し、図 1 の試薬と組み合わせて使用される。図 2 において、1 は多孔質シートの帯片からなる展開要素、2 は該展開要素 1 の一端に設けられ、適用される液体試料と試薬混合物を吸収し、展開要素 1 へ供給するための適用ゾーン、3 は展開要素中を移動拡散してきた、分析物、試薬、及び分析物と試薬の結合物を受け入れることができる吸収ゾーンである。前記適用ゾーン 2 と吸収ゾーン 3 との間に、検出ゾーン 4 が設けられ、オリゴヌクレオチド ON1 に相補的塩基配列を有するオリゴヌクレオチド ON1' が固定された第 1 検出ゾーン 5、オリゴヌクレオチド ON2 に相補的塩基配列を有するオリゴヌクレオチド ON2' が固定された第 2 検出ゾーン 6、オリゴヌクレオチド ON3 に相補的塩基配列を有するオリゴヌクレオチド ON3' が固定された第 3 検出ゾーン 7 が種類毎に各々独立して縞状となっている。

図 1 の試薬と図 2 の展開要素との組合せからなる分析キットを用いた簡易臨床診断方法を次に示す。分析物として抗原 A、抗原 B、抗原 C が含まれる液体試料を用い、容器中にて試薬と混合し、免疫学的親和性反応を行わせる。得られた反応液を展開要素 1 の適用ゾーン 2 へ適用する。この反応液の適用は、適用ゾーン 2 を反応液中に浸漬してもよいし、反応液を適用ゾーン 2 へ滴下、或いは塗布等により与えてもよい。反応液には、分析物、試薬、及び分析物と試薬とが複合化したマーカー標識化免疫複合体が含まれる。該反応液は、展開要素 1 中を毛管現象により移動又は拡散して、検出ゾーン 4 に移動し、ここで、マーカー標識化免疫複合体は、分析物の種類毎に塩基配列が予め定められた固定されたオリゴヌクレオチドと、マーカー標識化免疫複合体中に含まれるオリゴヌクレオチドとの相補的結合によりマーカー標識化免疫複合体が捕獲される。図 3 に、

図 1 及び図 2 に示されるキットを用いた簡易臨床診断方法により、  
マーカー標識化免疫複合体が分析物の種類毎に捕獲された様子を模  
式的に示す。

5 本発明の試薬成分のマーカー標識化配位子に含まれる第一配位子  
と、核酸標識化配位子に含まれる第二配位子は、同一の反応性を有  
するものであっても、また異なる反応性を有するものであってもよ  
い。また、第一配位子と第二配位子との組合せは、同一の抗原に対  
するモノクローナル抗体とポリクローナル抗体の組合せ、ポリクロ  
10 ーナル抗体相互の組合せ、結合部位の異なるモノクローナル抗体相  
互の組合せであってもよい。

液体試料中に含まれる分析対象となる分析物が、同種のカテゴリ  
ーに属さない化合物の混合体に対しても本発明は分析が可能である  
。例えば、抗原、抗体、核酸の同時分析も行うことができる。また  
、上記のサンドイッチ方式に限定されず、種々のパターンの拮抗的  
15 、或いは非拮抗的な分析手法が適用可能である。

核酸を構成する塩基配列は無限に近い膨大な種類が入手可能であ  
るので、検出ゾーンで検出可能な分析物の種類数は幾らでも可能で  
ある。

図 4 は、本発明の分析装置の別の態様を示し、試薬が装置の中に  
20 乾燥状態で一体となって含まれている分析装置である。図 4 の分析  
装置において、11 は帯状の多孔質シートの帯片シートを主たる構  
成部材とし必要に応じて補強シートが貼着された展開要素、12 は  
該展開要素 11 の一端に設けられ、適用される液体試料を吸収し、  
試薬を含んでいる封入ゾーン 18 及び展開要素 11 へ液体試料を供  
25 給するための適用ゾーン、13 は展開要素 11 中を移動拡散してきた  
、分析物、試薬、及び分析物と試薬の結合物を受け入れることが  
できる吸収ゾーンである。前記図 2 に示す分析装置との差異は、図

4 には、展開要素 1 1 と適用ゾーン 1 2 の間に、試薬を含ませた封入ゾーン 1 8 が設けられており、適用ゾーン 1 2 から封入ゾーン 1 8 へ供給される液体試料が展開要素 1 1 に移動できるように両者に緊密に接触している。

5 封入ゾーン 1 8 と吸収ゾーン 1 3 との間の展開要素 1 1 には、検出ゾーン 1 4 が設けられ、試薬の構成要素として含まれるオリゴヌクレオチド ON1 に対して相補的塩基配列を有するオリゴヌクレオチド ON1' が固定された抗原 A 分析用の第 1 検出ゾーン 1 5、オリゴヌクレオチド ON2 に相補的塩基配列を有するオリゴヌクレオチド ON2' が固定された抗原 B 分析用の第 2 検出ゾーン 1 6、オリゴ  
10 ヌクレオチド ON3 に相補的塩基配列を有するオリゴヌクレオチド ON3' が固定された抗体 C 分析用の第 3 検出ゾーン 1 7 が種類毎に各々独立して縞状となっている。

図 4 の分析装置の使用例として、目的とする分析物を抗原 A、抗原 B、抗体 C とし、分析すべき液体試料中に実際に抗原 A と抗体 C  
15 のみが含まれていた場合について次に説明する。図 5 は、その場合に分析装置の封入ゾーン 1 8 に乾燥状態で含まれている試薬の構成を示す。本態様の試薬構成は、図 1 の試薬構成と比較して、マーカ  
20 ー標識化抗体  $\alpha$  C がマーカ  
ー標識化抗原 C に、またオリゴヌクレオチド ON3 標識化抗体  $\alpha$  C がオリゴヌクレオチド ON3 標識化抗原 C に変更されているのみである。

まず分析物として抗原 A 及び抗体 C を含む液体試料が適用ゾーン 1 2 に適用されると、これらの分析物は毛管現象により、試薬成分と共に移動しながら、抗原 A はマーカ  
25 ー標識化抗体  $\alpha$  A 及びオリゴヌクレオチド ON1 標識化抗体  $\alpha$  A とサンドイッチ免疫複合体を形成し、抗原 A 分析用の第 1 検出ゾーン 1 5 に達し、そこでオリゴヌクレオチドの互いの相補的な塩基配列により捕獲される。また抗体



Cはマーカー標識化抗原C及びオリゴヌクレオチドON3 標識化抗原Cとサンドイッチ免疫複合体を形成し、抗体C分析用の第3検出ゾーン17に達し、そこでオリゴヌクレオチドの互いの相補的な塩基配列により捕獲される。しかし、液体試料中に抗原Bは存在していないため、サンドイッチ免疫複合体は形成されず、抗原B分析用の第2検出ゾーン16では、オリゴヌクレオチドON2 標識化抗体 $\alpha$ Bが捕獲される。このようにして各検出ゾーン15、16、17において捕獲されたサンドイッチ免疫複合体に含まれるマーカーについて、抗原A及び抗体Cの量の測定又は存在の検出が行なわれ、抗原Bは存在しないことが分かる。図6に、図4に示される分析装置を用いた簡易臨床診断方法により、マーカー標識化免疫複合体が分析物の種類毎に捕獲された様子を模式的に示す。

図7は分析物が核酸である場合において、本発明に従って、検出ゾーンで核酸が捕獲される原理を示す。図7において、分析物43はオリゴヌクレオチドON3 とオリゴヌクレオチドON2 をその配列中に含む核酸である。なお、分析物は一重鎖の核酸であっても、二重鎖の核酸であっても適用可能である。検出ゾーン40に固定化されている抗結合子41はオリゴヌクレオチドON1 を含む核酸である。試薬成分としては、マーカー標識化配位子44と核酸標識化配位子42からなり、該マーカー標識化配位子44は、分析物43中のオリゴヌクレオチドON3 に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドON3'を有する核酸とマーカーが結合されたものであり、該核酸標識化配位子42は分析物43中のオリゴヌクレオチドON2 に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドON2'と検出ゾーン40に固定化されている抗結合子41のオリゴヌクレオチドON1 に相補的な塩基配列を有する結合子としてのオリゴヌクレオチドON1'をその配列中に含む核酸である。

これらの試薬を含む本発明の分析キット又は分析装置を用いて目的とする核酸分析物の捕獲された結合モデルが図 7 に示される。試薬及び液体試料が本発明の分析装置中の展開要素に展開中に、分析物、試薬及び固定化抗結合子との相互反応により、抗結合子 4 1 のオリゴヌクレオチド ON1 と核酸標識化配位子 4 2 のオリゴヌクレオチド ON1' との相補的結合、核酸標識化配位子 4 2 のオリゴヌクレオチド ON2' と分析物 4 3 のオリゴヌクレオチド ON2 との相補的結合、分析物 4 3 のオリゴヌクレオチド ON3 とマーカー標識化配位子 4 4 のオリゴヌクレオチド ON3' との相補的結合が生じ、マーカー及び分析物 4 3 を含んだ複合体が抗結合子 4 1 に捕獲される。

本発明による分析方法によれば、免疫複合体等の生物学的親和性物質複合体の生成が、分析装置の適用前或いは適用後の早期に完了する。本発明の分析装置によれば、該生物学的親和性物質複合体の捕獲に適用される結合子及び抗結合子としての核酸の相補的結合は、一致率が高く、安定性の高い反応であり、免疫反応よりも強力に行えるために、生物学的親和性物質複合体は効率よく固相に結合させることができる。したがって従来のイムノクロマト法よりも高感度化が実現できる。

逆に、核酸とこれに相補的な一致率が低い核酸との組合せを選択した場合は、安定性の低い核酸の反応は免疫反応よりも弱いために、強い力価の抗体を用いた場合に遭遇する、感度が高すぎるために抗体量を減少させるといったことを行わなくても、核酸の配列によって検出感度のコントロールを行うことができる。こうしたことは、従来のイムノクロマト法では実現できなかったが、本発明により初めて実現できる特徴である。とくに、同時に複数項目を判定する必要がある場合は、それぞれの項目の正常域、異常域が異なってお

り、抗体の濃度、量を変化させるといったことが必要とされるケースがあるが、本発明の方法によればこの調整が大幅に簡略化される。

5 本発明における展開要素の検出ゾーン上に固定される抗結合子としての核酸の固定化手段には種々の方法が適用できる。抗結合子である核酸の5'末端または3'末端において、あるいは核酸の末端以外の任意の官能基の位置において、検出ゾーンの水不溶性担体に直接または導入された官能基を介してその核酸が共有結合されてい  
10 てもよい。また核酸に積極的に官能基を導入したものと、検出ゾーンの  
10 水不溶性担体に直接または導入された官能基を介してその核酸が共有結合されていてもよい。

核酸の検出ゾーンへの別の固定化手段として、他の物質を介在させて結合を行ってもよい。例えば、物理吸着により検出ゾーンに固定化されることが  
15 できる物質に核酸を生物学的親和性結合、共有結合等によって結合させておいて、得られた結合物を物理吸着により  
15 検出ゾーンへ固定化してもよい。例えば、ヌクレオチドの5'末端  
15 または3'末端において、あるいはヌクレオチドの任意の位置に導入された官能基の位置  
15 において、検出ゾーンに物理吸着可能な他の物質と、官能基を介して共有結合したものを、  
20 検出ゾーンに吸着させることにより行うことができる。例えば、タンパク質は不溶性担  
20 体に物理吸着可能な物質であり、該タンパク質のアミノ基にSH基を導入し、該SH基とオリゴ  
20 ヌクレオチドの5'末端に導入したマレイミド基を反応させてなる共有結合されたタンパク質を、物理吸  
20 着により検出ゾーンに固定化することができる。

25 他の物質と核酸の結合は、上記のような共有結合以外に、生物学的親和性によるものでもよい。このような他の物質には、例えば、  
25 タンパク質が挙げられる。該タンパク質の例には、アビジン、牛血

清アルブミン、免疫グロブリン等が挙げられる。なお、免疫グロブリンが、分析物に対して免疫学的親和性を有するときには、分析物との免疫学的結合を利用することにより、さらに分析感度のアップが望める。

5 図 8 は、分析物が抗原であり、抗原を検出するための分析装置として、検出ゾーン 14 において、I g G 抗体に抗結合子として核酸 20 が導入された核酸標識化 I g G 抗体 19 が不溶性担体に固定されている場合を示す。免疫化学的活性を有する核酸標識化 I g G 抗体 19 には核酸 20、20 が 2 個導入されており、このような核酸  
10 標識化 I g G 抗体 19 が検出ゾーン 14 に吸着されており、I g G 抗体を介して核酸 20 が固定化された状態となっている。

図 8 に示す検出ゾーン 14 において、サンドイッチ免疫複合体が捕獲された状態を図 9 に示す。図 9 において、核酸標識化 I g G 抗体 19 に捕獲される物質は、2 種類の免疫複合体が捕獲される。そ  
15 の一つは、分析物としての抗原 22、核酸標識化抗体 21 及びマーカー標識化抗体 23 により形成されたサンドイッチ免疫複合体であり、そして他の一つは、マーカー標識化抗体 23 と抗原 22 により形成された免疫複合体である。

即ち、図 9 によれば、核酸 20 が導入された核酸標識化 I g G 抗体 19 を検出ゾーン 14 に固定化することにより、抗原 22 の検出  
20 は、試薬成分としての核酸標識化抗体 21 中の核酸 24 と、検出ゾーン 14 に固定されている核酸標識化 I g G 抗体 19 中の核酸 20 の相補的結合により抗原が検出されるだけでなく、さらに加えて I g G 抗体自体の免疫化学的活性作用により結合された抗原 22 につ  
25 いても検出される。

従来法によれば、固定化された免疫化学的活性物質 1 分子に対して、2 分子の分析対象物しか結合できないが、本発明の該実施態様

によれば、従来法による分析よりも多くの分析対象物としての抗原が結合でき、この結果、多くの標識マーカーが結合できる。そのために、従来の分析法よりも、本発明の分析法による方が検出感度が高くなる。

5      図 1 0 は、アビジン 2 5 を物理吸着により検出ゾーン 1 4 に固相化してなるア固相化アビジンに対して、核酸 2 7 にビオチン 2 6 を導入してなるビオチン化核酸を結合させることにより、核酸 2 7 をビオチン-アビジンの反応により固相化したものである。

10      図 1 1 は、図 1 0 に示すビオチン-アビジンの反応により固相化した核酸とは別の態様の固相化核酸を示し、図 1 0 に示す核酸-ビオチン-アビジン複合体にさらに、核酸-ビオチン-アビジン複合体を核酸の相補的結合により結合させて核酸を固相化したものである。即ち、図 1 0 に示す手法により得られた核酸-ビオチン-アビジン複合体を検出ゾーンに結合させておき、次いで、先に固定した核酸 2 7 とは相補的な塩基配列の核酸 2 8 にビオチン 2 6 を導入したビオチン化核酸とアビジン 2 5 からなる複合体を形成し、先の核酸-ビオチン-アビジン複合体中の核酸 2 7 との相補的結合により、核酸 2 8 を有する複合体を結合させて、核酸 2 8 を固相化したものである。

20      図 1 1 に示す手段により得られた核酸固相化検出ゾーンは、検出ゾーン上において 3 次元的に成長しており、図 1 0 に示す態様の核酸固定化手段よりも多くの抗結合子としての核酸を含ませることができるので、より多くの免疫複体の捕獲が可能となり、検出感度が高くなる。

25      上記 2 種の態様に用いたアビジンの代わりにストレプトアビジンを用いることによっても同様に、核酸結合不溶性支持体を調製することが可能である。上記のようにして、本発明の分析装置を得る。

本発明の分析装置はテストストリップ単独として使用することができ、また、該テストストリップをケースに入れて使用することもできる。一般的に、患者から採取された血液、血清、血漿などは、感染性の微生物が混入している可能性も高いために、本発明の分析装置をテストストリップ単独として使用するには、感染の可能性の問題も考慮する必要がある。この感染の問題点を軽減し、手で直接テストストリップを触れることなく扱うことのできる方法として、テストストリップをプラスチック製ケース等の保護ケースにに入れて取り扱うことは好ましい態様である。

テストストリップをケースに収容する手段には、例えば、図 1 2 に示す手段が使用できる。即ち、2つの穴のあるプラスチック製ケース 2 9 の中にテストストリップを封入しておき、一方の穴は、テストストリップの適用ゾーンに対応した試料適用口 3 0 であり、他方の孔は、テストストリップの捕捉用核酸が結合している検出ゾーン 1 4 において、分析物が捕獲された様子が観察できるような検出窓 3 1 となっている。このプラスチック製ケース 2 9 に入れたテストストリップにより、微生物による検査を行っている人への検体による感染の可能性を大幅に軽減することが可能となる。該プラスチック製ケース 2 9 の材料として好適なプラスチックの例には、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリプロピレン、アクリル樹脂、エチレン塩化ビニル、フッ化ポリビニデン等が挙げられる。

次に、実施例に基づき本発明をさらに詳しく説明する。

#### 実施例 1

##### 工程 1 : ビオチン化オリゴヌクレオチドの調製

5' 末端にアミノ基を有する以下のようなオリゴヌクレオチドをパーキンエルマー社製 DNA 合成装置 3 9 1 A を用いて、それぞれ合成した。

アミノ基-G A A T T C C C G G G G A T C C G T C  
G (以下、ペア 1 +)

アミノ基-C G A C G G A T C C C C G G G A A T T  
C (以下、ペア 1 -)

5 アミノ基-A A C G G A A T C T A A T C A G G A G  
G (以下、ペア 8 +)

アミノ基-C C T C C T G A T T A G A T T C C G T  
T (以下、ペア 8 -)

これらのオリゴヌクレオチド 3 0 0 n m o l をそれぞれ 1 m M  
10 E D T A を含む 0 . 1 M M O P S 緩衝液 p H 7 . 0 に溶解した溶  
液中に、N-ヒドロキシスクシンイミド-ビオチン (ピアス社製 N  
H S - B i o t i n ) 3 0 μ m o l を N' , N' -ジメチルホルム  
アミド (以下、D M F ) に溶解した溶液をそれぞれ加え、3 7 ° C 1  
時間反応させた。反応後、エタノール沈澱法によりビオチン化した  
15 オリゴヌクレオチドを分離した。この操作により、いずれの配列も  
ほぼ 8 0 ~ 9 0 % のビオチン化したオリゴヌクレオチドが回収でき  
た。

## 工程 2 : 抗 H B s 抗体及び抗 C R P 抗体の調製

B型肝炎表面抗原 (以下 H B s ) に対する抗体は、明治乳業 (株)  
20 ) より購入した H B s を定法通り、ウサギあるいはマウスに免疫し、  
ウサギからはポリクローン抗体をマウスからはクローニングを行  
いモノクローン抗体を調製した。また、C反応性タンパク質 (以下  
C R P ) に対する抗体は、札幌臨床検査センターより購入した C R  
P を定法通り、ウサギあるいはマウスに免疫し、ウサギからはポリ  
25 クローン抗体をマウスからはクローニングを行いモノクローン抗体  
を調製した。それぞれの抗体は I g G まで精製し、以下の実験に供  
した。

工程 3 : 金コロイド標識化抗 H B s 抗体及び金コロイド標識化抗 C R P 抗体の調製

前記工程 2 で得られたウサギポリクローン抗 H B s 抗体を金コロ  
イドにより標識した。すなわち、ザイメッド社製粒径 1 0 n m の金  
コロイドを、ソフトサイエンス社刊 横田ら編 イムノゴールド法  
5 ( 1 9 9 2 ) に従って、金コロイド標識ウサギポリクローン抗 H B  
s 抗体を調製した。また、同様に前記工程で得られたマウスモノク  
ローン抗 C R P 抗体を金コロイドにより標識した。

10 工程 4 : オリゴヌクレオチド標識化抗体 ( ペア 8 + 標識化抗 C R  
P - I g G 、 ペア 1 - 標識化 B S A 、 ペア 1 + 標識化抗 H B s - I  
g G ) の調製

前記工程 2 で得られたウサギポリクローン抗 H B s - I g G 1  
0 m g を 0 . 2 M ほう酸ナトリウム緩衝液 p H 8 . 5 2 . 3 m l  
に溶解し、ここに無水 S - アセチルメルカプトコハク酸 1 . 3 3 m  
15 g を溶解させた D M F 0 . 2 5 m l を添加し、 3 7 ° C 1 時間反応さ  
せた。反応後、 1 M T r i s 塩酸緩衝液 ( p H 7 . 0 ) と 1 M  
ヒドロキシルアミン ( p H 7 . 0 ) をそれぞれ 0 . 5 m l ずつ添加  
し、 3 7 ° C 3 0 分間反応させた。

この後、ファルマシア製 S e p h a d e x G - 2 5 を充填し、  
20 5 m M E D T A を含む 0 . 1 M リン酸ナトリウム緩衝液 p H 6  
. 0 で平衡化した直径 1 c m 長さ 4 5 c m のカラムに適用し、スル  
フヒドリル基導入抗 H B s - I g G 9 . 7 4 m g を得た。Y. Oku  
らの方法 ( Microbiol. Immunol., 32, 807-816, 1988 ) の方法に  
従いスルフヒドリル基を定量したところ、 I g G 1 分子あたり 2  
25 . 8 4 分子のスルフヒドリル基が導入されていることが確認できた  
。

一方、ペア 1 - 3 0 3 n m o l を含む 0 . 1 M 3 - モルホリノ



プロパンスルフォニックアシド（以下、MOPS）緩衝液 pH 7.0 0.8 ml に、N-( $\epsilon$ -マレイミド-カプロイルオキシ) スクシンイミド（以下、EMCS）10 mg を溶解した 300  $\mu$ l の DMF を添加し、37°C 30 分反応させた。反応後、エタノール沈澱  
5 法によりマレイミド基導入オリゴヌクレオチドを精製した。225 nmol のオリゴヌクレオチドが回収され、マレイミド基を定量したところ、オリゴヌクレオチド 1 分子あたり 1.2 分子のマレイミド基が導入されていることが確認できた。

次に、得られたスルフヒドリル基導入抗 H B s - I g G とマレイ  
10 ミド基導入オリゴヌクレオチドを混合し、37°C 1 時間反応させ、5 mM EDTA を含む 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 pH 6.0 で平衡化した直径 1.5 cm 長さ 45 cm のカラムに適用した。分画したフラクションについて 280 nm と 260 nm における吸光度を測定しオリゴヌクレオチド標識抗 H B s - I g G に相当する  
15 フラクションを収集し、アミコン社製限外濾過膜 YM-30 により濃縮した。

この収集した分画についてピアス社の BCA プロテインアッセイキットを用いてタンパク定量を行い、濃度が 2.12 mg/ml であることがわかった。以下この複合体を「ペア 1 - 標識化抗 H B s  
20 - I g G」と略記する。

これと同様の方法により、前記工程 2 で得られたマウスモノクローン抗 C R P - I g G にペア 8 + を導入してなるペア 8 + 標識化抗 C R P - I g G、牛血清アルブミン（以下 B S A）にペア 1 - を導入してなるペア 1 - 標識化 B S A、及び抗 H B s - I g G に P a i  
25 r 1 + を導入してなるペア 1 + 標識化抗 H B s - I g G を調製した。

工程 5 : オリゴヌクレオチド標識化抗 H B s - F a b' の調製

前記工程 2 で得られたウサギポリクローン抗 H B s - I g G 1  
2. 7 2 m g を 0. 1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 p H 4. 5 に溶解  
した。ここに 0. 2 5 m g のペプシン（ベーリンガー・マンハイム社  
製）を添加して 3 7 ° C 1 5 時間反応させた。反応後、5 m M E D  
5 T A を含む 0. 1 M リン酸ナトリウム緩衝液 p H 6. 0 で平衡化  
した直径 1. 5 c m 長さ 4 5 c m の I B F b i o t e c h n i q u e s 社製 U l t r  
o g e l A c A 4 4 樹脂を充填したカラムに適用した。F ( a b  
' ) <sup>2</sup> に相当する画分を収集し、これを濃縮した。ここで得た F ( a b  
' ) <sup>2</sup> の内 4. 9 4 m g に終濃度が 1 0 m M になるようにメ  
10 ルカプトエチルアミンを添加し、3 7 ° C 9 0 分間反応させた。反応  
後、5 m M E D T A を含む 0. 1 M リン酸ナトリウム緩衝液 p  
H 6. 0 で平衡化した直径 1 c m 長さ 4 5 c m の S e p h a d e x  
G - 2 5 を充填したカラムに適用した。ヒンジ部スルフヒドリル  
基が露出した F a b ' に相当する画分を収集し、Y M - 3 0 により  
15 濃縮してスルフヒドリル基導入 F a b ' を得た。3. 3 m g の F a  
b ' が回収された。また、スルフヒドリル基の定量を行ったところ  
、1 分子の F a b ' に対して 1. 1 2 分子のスルフヒドリル基が導  
入されていることがわかった。

一方、ペア 1 + のオリゴヌクレオチド 2 5 0 n m o l を 1 m M  
20 E D T A を含む 0. 1 M M O P S 緩衝液 p H 7. 0 に溶解し、  
これに 7. 7 m g の E M C S を含む D M F を添加し、3 7 ° C 1 時間  
反応させた。エタノール沈澱によりマレイミド基導入オリゴヌクレ  
オチドを精製し、5 m M E D T A を含む 0. 1 M リン酸ナトリ  
ウム緩衝液 p H 6. 0 に溶解した。回収されたマレイミド基導入  
25 オリゴヌクレオチドは 2 3 1 n m o l で、1 分子のオリゴヌクレオ  
チドに 0. 7 3 分子のマレイミド基が導入されていることがわかつ  
た。

得られたスルフヒドリル基導入 Fab' とマレイミド基導入オリ  
ゴヌクレオチドを混合し、37℃1時間反応させ、反応後、5 mM  
EDTAを含む0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 pH 6.0 で  
5 平衡化した直径1.5 cm長さ45 cmのUltragel Ac  
A 44を充填したカラムに適用した。分画したフラクションについ  
て280 nmと260 nmにおける吸光度を測定し、オリゴヌクレ  
オチド標識化抗HBs-Fab' に相当するフラクションを収集し  
、限外濾過膜（アミコン社製YM-30）により濃縮した。この収  
集した分画についてプロテインアッセイキット（ピアス社製BCA  
10 プロテインアッセイキット）を用いてタンパク定量を行い、濃度が  
5.72 mg/mlであることがわかった。

#### 工程6：固相化アビジンの調製

リン酸緩衝生理食塩水（日水製薬（株）製PBS（-））20 m  
lに10 mgのアビジンを溶解し、5×10 cmに切断したメンブ  
15 レン（ミリポア社製 SPHFメンブレン）を室温でこの溶液中に  
1時間浸し、その後蒸留水でメンブレンを洗浄した。洗浄後、風乾  
し、前記工程1で調製した258 nmol/mlの濃度のビオチン  
標識ペア1-をソフトペン（プラチナ万年筆（株）製）に染み込  
ませて、5 cmの辺に対して2等分するように直角に線を引き、ビ  
20 チン標識ペア1-をアビジン結合SPHFメンブレンに結合させた  
。風乾後、ブロッキング剤（雪印乳業（株）製ブロックエース）に  
よりブロッキングを室温で30分行い、蒸留水でメンブレンを洗  
浄し、その後風乾してペア1-結合メンブレンを得た。次いで、ペ  
ーパーカッターにより幅0.5 cm縦5 cmになるように切断し、一  
25 端にグラスフィルター（ワットマン社製、以下、GF）をホットキ  
スにより固定し乾燥条件下保存した。

#### 工程7：サンドイッチ免疫複合体のメンブレンへの捕獲

リン酸緩衝生理食塩水（日水製薬（株）製PBS（-））に0.1%BSA、0.35M塩化ナトリウムを添加した溶液（以下、MPBS）を用いて、前記工程4において調製した、ペア1+標識化抗HBs-IgGを終濃度1.54 $\mu$ g/mlになるように、また、前記工程3において調製した金コロイド（金コロイド標識化抗HBs抗体）は520nmにおける吸光度が0.5になるように調製した。ここにHBs抗原がそれぞれ終濃度100ng/ml、50ng/ml、あるいは0ng/mlになるように加え、このうち100 $\mu$ lを試験管に分注した。前記工程6において調製したペア1-結合メンブレンを、GFが上になるように速やかに投入し、反応性を確認した。その結果、HBs終濃度100ng/mlと50ng/mlにおいて反応性が確認された。対象としたHBsを含まない溶液（0ng/ml）では反応性は確認されなかった。この結果は、ペア1+標識化抗HBs-IgGとHBs抗原と金コロイド標識化抗HBs抗体とから、サンドイッチ免疫複合体が形成され、該サンドイッチ免疫複合体中のペア1+と、ペア1-結合メンブレンのペア-とが相補的に結合され、該サンドイッチ免疫複合体がメンブレンに捕獲されたことを示す。

## 実施例 2

20 工程1：ペア1+標識化アビジン及びペア1-標識化アビジンの調製

前記実施例1の工程1において調製したビオチン標識ペア1+112nmolとアビジン1.52mgをMPBS0.7ml中で37℃3時間反応させ、その後、PBSで平衡化したIBF biotechniques社製Ultrage1AcA44樹脂に適用し、ペア1+標識化アビジンを得た。また、同様の方法により、ペア1-標識化アビジンを得た。

工程 2 : オリゴヌクレオチド-アビジンマトリクス結合メンブレンの調製

リン酸緩衝生理食塩水（日水製薬製 P B S ( - ) ） 2 0 m l に 1  
0 m g のアビジンを溶解し、 $5 \times 10$  c m に切断したメンブレン（  
5 ミリポア社製 S P H F メンブレン）を室温で 1 時間この溶液中に  
浸し、その後蒸留水でメンブレンを洗浄した。洗浄後、風乾し、実  
施例 1 で調製した  $258 \text{ nmol} / \text{ml}$  の濃度のビオチン標識化ペ  
ア 1 - をソフトペン（プラチナ万年筆（株）製）に染み込ませて、  
5 c m の辺に対して 2 等分するように直角に線を引き、ビオチン標  
10 識化ペア 1 - をアビジン結合 S P H F メンブレンに結合させた。風  
乾後、ブロッキング剤（雪印乳業（株）製ブロックエース）により  
ブロッキングを室温で 30 分間行い、蒸留水でメンブレンを洗浄し  
、ペア 1 - 結合 S P H F メンブレンを調製した。本実施例 2 の前記  
工程 1 で調製したペア 1 + 標識化アビジン  $1 \mu \text{g} / \text{ml}$  とペア 1 -  
15 標識アビジン  $2 \mu \text{g} / \text{ml}$  を含む M P B S にペア 1 - 結合 S P H F  
メンブレンを室温下 1 時間反応させ、オリゴヌクレオチド-アビジ  
ンマトリクス結合メンブレンを調製した。メンブレンを蒸留水で洗  
浄後、風乾した。その後、ペーパーカッターにより幅 0.5 c m 縦  
5 c m になるように切断し、一端に G F をホッチキスにより固定し  
20 乾燥条件下保存した。

工程 3 : サンドイッチ免疫複合体のメンブレンへの捕獲

M P B S を用いて、前記実施例 1 の工程 4 において調製した、ペ  
ア 1 + 標識化抗 H B s - I g G を終濃度  $1.54 \mu \text{g} / \text{ml}$  になる  
ように、また、前記実施例 1 の工程 3 において調製した金コロイド  
25 標識化抗 H B s 抗体は  $520 \text{ nm}$  における吸光度が 0.5 になるよ  
うに調製した。ここに H B s 抗原がそれぞれ終濃度  $100 \text{ ng} / \text{ml}$ 、  
 $80 \text{ ng} / \text{ml}$ 、 $60 \text{ ng} / \text{ml}$ 、 $40 \text{ ng} / \text{ml}$ 、 $20 \text{ ng}$

／m l、あるいは0 n g／m lになるように加え、このうち100  
μ lを試験管に分注した。本実施例2の前記工程2において調製し  
たオリゴヌクレオチド－アビジンマトリクス結合メンブレンを、G  
Fが上になるように速やかに投入し、反応性を確認した。その結果  
5、H B s 終濃度100 n g／m l、80 n g／m l、60 n g／m  
lにおいて反応性が確認された。40 n g／m l以下の濃度では反  
応性は確認されなかった。

### 実施例3

#### 工程1：ペア1－結合S P H Fメンブレンの調製

10 前記実施例1の工程4で調製した2 m g／m lの濃度のペア1－  
標識化B S Aをソフトペン（プラチナ万年筆（株）製）に染み込ま  
せて、5×10 c mに切断したメンブレン（ミリポア社製 S P H  
Fメンブレン）の5 c mの辺に対して2等分するように直角に線を  
引き、物理吸着によりメンブレンに結合させた。風乾後、ブロッキ  
15ング剤（雪印乳業（株）製ブロックエース）によりブロッキングを  
室温で30分間行い、蒸留水でメンブレンを洗浄し、ペア1－結合  
S P H Fメンブレンを調製した。風乾後、ペーパーカッターにより  
幅0.5 c m縦5 c mになるように切断し、一端にG Fをホッチキ  
スにより固定し乾燥条件下保存した。

#### 20 工程2：サンドイッチ免疫複合体のメンブレンへの捕獲

M P B Sを用いて、前記実施例1の工程4において調製した、ペ  
ア1＋標識化抗H B s－I g Gを終濃度1.54 μ g／m lになる  
ように、また、前記実施例1の工程3において調製した金コロイド  
（金コロイド標識化抗H B s 抗体）は520 n mにおける吸光度が  
25 0.5になるように調製した。ここにH B s 抗原がそれぞれ終濃度  
100 n g／m l、50 n g／m l、25 n g／m l、10 n g／  
m l、5 n g／m lあるいは0 n g／m lになるように加え、この

うち  $100\ \mu\text{l}$  を試験管に分注した。本実施例 3 の前記工程 1 において調製したペア 1 - 結合 SPHF メンブレンを、GF が上になるように速やかに投入し、反応性を確認した。その結果、HBs 終濃度  $100\ \text{ng/ml}$ 、 $50\ \text{ng/ml}$ 、 $25\ \text{ng/ml}$ 、 $10\ \text{ng/ml}$ 、 $5\ \text{ng/ml}$  において反応性が確認された。 $0\ \text{ng/ml}$  の濃度では反応性は確認されなかった。

#### 実施例 4

##### 工程 1 : (ペア 1 -) + (抗 HBs - IgG) 結合 SPHF メンブレンの調製

前記実施例 1 の工程 4 で調製した  $0.5\ \text{mg/ml}$  の濃度のペア 1 - 標識化抗 HBs - IgG をソフトペン (プラチナ万年筆 (株) 製) に染み込ませて、 $5 \times 10\ \text{cm}$  に切断したメンブレン (ミリポア社製 SPHF メンブレン) の  $5\ \text{cm}$  の辺に対して 2 等分するように直角に線を引き、物理吸着により該メンブレンに結合させた。風乾後、ブロッキング剤 (雪印乳業 (株) 製ブロックエース) によりブロッキングを室温で 30 分間行い、蒸留水でメンブレンを洗浄し、(ペア 1 -) + (抗 HBs - IgG) 結合 SPHF メンブレンを調製した。風乾後、ペーパーカッターにより幅  $0.5\ \text{cm}$  縦  $5\ \text{cm}$  になるように切断し、一端に GF をホッチキスにより固定し乾燥条件下保存した。

##### 工程 2 : サンドイッチ免疫複合体のメンブレンへの捕獲

MPBS を用いて、前記実施例 1 の工程 5 において調製した、ペア 1 + 標識化抗 HBs - Fab' を終濃度  $1.54\ \mu\text{g/ml}$  になるように、また、前記実施例 1 の工程 3 において調製した金コロイドは  $520\ \text{nm}$  における吸光度が 0.5 になるように調製した。ここに HBs 抗原がそれぞれ終濃度  $100\ \text{ng/ml}$ 、 $50\ \text{ng/ml}$ 、 $25\ \text{ng/ml}$ 、 $10\ \text{ng/ml}$ 、 $5\ \text{ng/ml}$ 、 $2.5\ \text{ng}$

／m lあるいは0 n g／m lになるように加え、このうち100  $\mu$   
lを試験管に分注した。前記実施例4において調製した（ペア1－  
）＋（抗HBs－IgG）結合SPHFメンブレンを、GFが上にな  
るように速やかに投入し、反応性を確認した。その結果、HBs  
5 終濃度100 n g／m l、50 n g／m l、25 n g／m l、10  
n g／m l、5 n g／m l、2.5 n g／m lにおいて反応性が確  
認された。0 n g／m lの濃度では反応性は確認されなかった。

#### 実施例5

##### 分析装置の調製

10 図13は本実施例5で使用したストリップ状の分析装置である。  
図13のストリップにおいて、109はハイランド社製オーバーヘ  
ッドプロジェクター用フィルムであり、本実施例5の分析装置の補  
強用支持フィルムとして用いた。該支持フィルム109上に、両面  
テープ（ニチバン社製）107を介して、該両面テープ107の両  
15 端の部位を除いた全面に、ストリップ状のSPHFメンブレン10  
2を貼着して展開要素を構成した。該SPHFメンブレン102は  
前記実施例1の工程6と同様の処理により調製したもので中間あた  
りの検出ゾーン106の位置にペア1－を結合させたものである。  
該展開要素の一端に、ブロッキング剤（雪印乳業（株）製 ブロ  
20 ックエース）により予めブロッキング処理を施した濾紙（アドバン  
テック社製）からなる適用ゾーン101を設け、さらに該適用ゾ  
ン101と展開要素との間に試薬を含ませた封入ゾーン105を両  
者に緊密に接触させて、適用された液体試料が移動可能なように配  
置した。該封入ゾーン105は、ブロッキング剤（雪印乳業（株）  
25 製 ブロックエース）により予めブロッキング処理を施したグラス  
ペーパーシート（ミリポア社製）で製造されており、該封入ゾ  
ン105には金コロイド標識化ウサギ抗HBs－IgG103が0.



1 5  $\mu$ g、ペア1 + 標識化抗HBs-IgG104が一定量含まれている。該金コロイド標識化ウサギ抗HBs-IgG103は前記実施例1の工程3により調製したものであり、該ペア1 + 標識化抗HBs-IgG104は前記実施例1の工程4において調製したものである。該展開要素の他端には、GFからなる吸収ゾーン108を配置した。このようにして得られたHBs抗原検出のための分析装置のストリップの幅は5mmで、長さ60mmであり、これを乾燥条件下保存した。

#### 分析例

10 本実施例5の前記工程で得られたHBs抗原検出用の分析装置の適用ゾーン101に、HBs抗原100ng/mlになるように調製したMPBS100 $\mu$ lを添加し、一方、別に用意した同じHBs抗原検出用の分析装置の適用ゾーン101に、何も含まないMPBS100 $\mu$ lを添加した。それぞれの分析装置において30分後  
15 反応性を確認した。HBs抗原100ng/mlを添加したストリップは、検出ゾーン106に金コロイドの着色が認められたが、MPBSのみを添加したストリップについては着色は認められなかった。

#### 実施例6

#### 20 分析装置の調製

ナイロンメンブレン（ポール社製のバイオダイnC）を5 x 10cmに切断し、20% EDC溶液中に15分間浸漬し、蒸留水で洗浄後、風乾し、活性化バイオダイnCを調製した。この活性化バイオダイnCに、前記実施例1の工程1で調製した20 $\mu$ g/ml  
25 の濃度のアミノ基-ペア1-をソフトペン（プラチナ万年筆（株）製）に染み込ませて、5cmの辺に対して2等分するように直角に線を引き、ペア1-をバイオダイnCに結合させた。このバイオダ

インCを蒸留水で洗浄した後、ブロッキング剤（雪印乳業（株）製  
ブロックエース）で1時間ブロッキングを行い、再び蒸留水で洗  
浄後、風乾させた。風乾後、ペーパーカッターにより、幅0.5c  
m縦5cmになるように切断し、一端にGFをホッチキスにより固  
5 定し、乾燥条件下で保存した。

このようにして得られたHBs抗原検出のための分析装置に対  
して、MPBSを用いて、前記実施例1の工程4において調製した  
、ペア1+標識化抗HBs-IgGを終濃度1.54 $\mu$ g/mlに  
なるように、また、前記実施例1の工程3において調製した金コロ  
10 イドは520nmにおける吸光度が0.5になるように調製した。

#### 分析例

本実施例6の前記工程で得られたHBs抗原検出用の分析装置の  
適用ゾーンに、HBs抗原がそれぞれ終濃度20 $\mu$ g/ml、ある  
いは0ng/mlになるように加え、このうち100 $\mu$ lを試験管  
15 に分注した。本実施例6の前記工程で調製したペア1-結合バイオ  
ダインCを、GFが上になるように速やかに投入し、反応性を確認  
した。その結果、HBs終濃度20 $\mu$ g/mlにおいて反応性が確  
認された。0濃度では反応性は確認されなかった。

#### 実施例7

#### 20 分析装置の調製

リン酸緩衝生理食塩水（日水製薬製PBS（-））20mlに1  
0mgのアビジンを溶解し、5×10cmに切断したSPHFメン  
ブレンを室温で1時間浸し、蒸留水で該メンブレンを洗浄した。洗  
浄後、風乾し、前記実施例1の工程1で調製した258nmol/  
25 mlの濃度のビオチン標識化ペア1-をソフトペン（プラチナ万年  
筆（株）製）に染み込ませて、5cmの辺に対して一端から2cm  
のところに直角に線を引き、ビオチン標識化ペア1-をアビジン結

合 S P H F メンブレンに結合させた。同様に、ビオチン標識化ペア  
8 - をソフトペン（プラチナ万年筆（株）製）に染み込ませて、5  
c m の辺に対して別的一端から 2 c m のところに直角に線を引き、  
5 ビオチン標識化ペア 8 - をアビジン結合 S P H F メンブレンに結合  
させた。ビオチン-アビジン結合により得られたペア 8 - 固相化 S  
P H F メンブレンを風乾した後、ブロッキング剤（雪印乳業（株）  
製 ブロックエース）によりブロッキングを室温にて 3 0 分行い、  
蒸留水でメンブレンを洗浄し、その後風乾した。風乾後、ペーパ  
10 カッターにより幅 0 . 5 c m 縦 5 c m になるように切断し、一端に  
ワットマン社製グラスフィルター（以下 G F ）をホッチキスにより  
固定し乾燥条件下保存して、本実施例 7 で使用する分析装置とした  
。

#### 分析例

リン酸緩衝生理食塩水（日水製薬（株）製 P B S （ - ））に 0 .  
15 1 % B S A 、 0 . 3 5 M 塩化ナトリウムを添加した M P B S を用  
いて、前記実施例 1 の工程 4 において調製した、ペア 1 + 標識化抗  
H B s - I g G およびペア 8 + 標識化抗 C R P - I g G がそれぞれ  
終濃度 1 . 5 4  $\mu$  g / m l になるように、また、前記実施例 1 の工  
程 3 において調製した金コロイド標識化抗 H B s - I g G および金  
20 コロイド標識化抗 C R P - I g G は、5 2 0 n m における吸光度が  
それぞれ 0 . 5 になるように試験液溶液を調製した。

本実施例 7 の前記工程で得られた試験溶液に、H B s 抗原、C R  
P 抗原両方とも終濃度が 1 0 0 n g / m l になるように加えたもの  
、H B s 抗原のみ終濃度が 1 0 0 n g / m l になるように加えたもの、  
25 C R P 抗原のみ終濃度が 1 0 0 n g / m l になるように加えた  
もの、両方の抗原とも含まないものの 4 種類の異なる検体を準備し  
、このうち 1 0 0  $\mu$  l をそれぞれ別の試験管に分注した。本実施例

7の前記工程で調製したペア8－固相化S P H Fメンブレンからなる分析装置を、G Fが上になるように速やかに投入し、反応性を確認した。その結果、両者を含む検体はペア1－、ペア8－両方の結合領域が着色した。H B s 抗原のみを含む検体は、ペア1－結合領域のみが着色した。C R P 抗原のみを含む検体は、ペア8－結合領域のみが着色した。また、両者とも含まない検体は、ペア1－、ペア8－両方の結合領域とも着色しなかった。

### 実施例 8

#### 分析装置の調製

10 図14～図16は本実施例8に使用した分析装置を示し、図14はその分析装置の長手方向切断面、図15は側面図、図16は上面図を示す。図14～図16において201はプラスチック製のケースであり、上部ケース202と、下部ケース203に分解できる。下部ケース203に前記実施例5において調製したストリップ状の分析装置を設置し、上部ケース203を被せて一体化させた。

さらに、該ストリップ状の分析装置の適用ゾーンと検出ゾーンの位置に対応する上部ケース202の部位には、それぞれ試料適用口204及び検出窓205が空いている。該ケース201中に前記実施例5で調製したストリップ状の分析装置が配設することによって本実施例8のH B s 抗原検出用分析装置を得た。このデバイスは乾燥条件下保存した。

#### 分析例

本実施例8の前記工程で調製したH B s 抗原検出用分析装置の、試料適用口204にH B s 抗原100 ng / mlになるように調製したM P B S 100  $\mu$  lを添加し、および別に用意した同じH B s 抗原検出用分析装置に対して、何も含まないM P B S 100  $\mu$  lを添加し、それぞれ30分後に検出窓205から観察できるペア1－

を結合させた検出ゾーン 106 の反応性を確認した。H B s 抗原 100 ng / ml を添加した分析装置の方は、金コロイドの着色が認められたが、M P B S のみを添加した分析装置については着色は認められなかった。

5 比較例 1

本比較例 1 は抗体を結合子として検出ゾーンに固定化した従来法による検出感度と本発明による検出感度の比較のためのものである。

分析装置の調製

10 0. 2 mg / ml の濃度のウサギ抗 H B s - I g G をソフトペン（プラチナ万年筆（株）製）に染み込ませて、5 × 10 cm に切断したメンブレン（ミリポア社製 S P H F メンブレン）の 5 cm の辺に対して 2 等分するように直角に線を引き、物理吸着によりウサギ抗 H B s - I g G を S P H F メンブレンに結合させた。風乾後、  
15 ブロッキング剤（雪印乳業（株）製ブロックエース）によりブロッキングを室温で 30 分間行い、蒸留水でメンブレンを洗浄し、ウサギ抗 H B s - I g G 結合 S P H F メンブレンを調製した。風乾後、ペーパーカッターにより幅 0. 5 cm 縦 5 cm になるように切断し、一端に G F をホッチキスにより固定し乾燥条件下保存して本比較  
20 例 1 の分析装置とした。なお、0. 2 mg / ml を越える濃度のウサギ抗 H B s - I g G を用いた場合は、非特異反応が高くなるために、0. 2 mg / ml のウサギ抗 H B s - I g G を用いた。

分析例

従来法による検出感度は以下のような実験により評価した。すな  
25 わち、前記実施例 1 の工程 3 において調製した金コロイドは 520 nm における吸光度が 0. 5 になるように試薬溶液を調製した。得られた試薬溶液に、H B s 抗原がそれぞれ終濃度 100 ng / ml

、50 ng/ml、25 ng/ml、10 ng/ml、5 ng/ml、2.5 ng/mlあるいは0 ng/mlになるように加えた。

5 得られた各試薬－抗原混合液について100  $\mu$ lを各試験管に分注した。本比較例1の前記工程において調製した抗HBs－IgG結合SPHFメンブレンからなる本比較例1の分析装置を、GFが上になるように、本比較例1の前記工程で調製した抗原溶液と試薬混合溶液が収容されている試験管中に速やかに投入し、反応性を確認した。その結果、HBs終濃度100 ng/ml、50 ng/ml、25 ng/ml、10 ng/mlにおいて反応性が確認された。  
10 。10 ng/ml未満の濃度では反応性は確認されなかった。

一方、本発明による方法の検出感度は以下のような実験により評価した。すなわち、MPBSを用いて、前記実施例1の工程5において調製した、ペア1＋標識抗HBs－Fab'を終濃度1.54  $\mu$ g/mlになるように、また、前記実施例1の工程3において調製した金コロイドは520 nmにおける吸光度が0.5になるように試薬溶液を調製した。得られた試薬溶液にHBs抗原がそれぞれ終濃度100 ng/ml、50 ng/ml、25 ng/ml、10 ng/ml、5 ng/ml、2.5 ng/mlあるいは0 ng/mlになるように加えた。  
15

20 得られた各試薬－抗原混合溶液について100  $\mu$ lを各試験管に分注した。前記実施例4において調製した（ペア1－）＋（抗HBs－IgG）結合SPHFメンブレンを、GFが上になるように速やかに投入し、反応性を確認した。その結果、HBs終濃度100 ng/ml、50 ng/ml、25 ng/ml、10 ng/ml、5 ng/ml、2.5 ng/mlにおいて反応性が確認された。  
25 0 ng/mlの濃度では反応性は確認されなかった。

以上の結果より、本発明による核酸を結合子及び抗結合子とした

分析装置による場合、従来の免疫化学的活性物質を結合子及び抗結合子としたものよりも4倍検出感度が高いことがわかった。

#### 産業上の利用可能性

- 5      本発明によれば、固相化された抗結合子としての核酸と、生成された複合体に含まれる結合子としての核酸との相補的結合は、一致率が高く、安定性の高い反応であり、免疫反応よりも強力に行えるために、分析物を含む生物学的親和性物質複合体は効率よく固相に結合させることができる。また、抗結合子としての核酸の固相化に
- 10      おいて、他の物質、例えば、タンパク質等の高分子等を介して核酸を結合させた場合、タンパク質に比べて、小さい分子の核酸をタンパク質に結合することができ、しかも、タンパク質分子よりも多くの数の核酸分子（抗結合子）を結合させることができる。したがって、分析物を含む生物学的親和性物質複合体をより多く捕獲することが可能となり、従来のイムノクロマト法よりも高感度化が実現できる。
- 15

- 本発明によれば、マーカー標識化第一配位子と核酸標識化配位子と分析物との反応によって生成される複合体を、クロマト的に移動させて、検出ゾーンにおいて捕獲してその量を測定或いはその存在
- 20      を検出するのに、固相化された核酸と、生成された複合体に含まれる核酸との相補的結合により捕獲しているので、1種類以上乃至無限に近い数までの分析物を分析物の種類毎にゾーンを形成して測定或いは検出することができる。

- 本発明の簡易臨床診断方法によれば、固相化された核酸と、生成
- 25      された複合体に含まれる核酸との相補的結合において、相互の核酸の相補的塩基の一致率を変化させることにより、分析物を測定又は検定するときの検出感度のコントロールの調整を簡略に行うことが

できる。このような特徴は、同時に複数項目を判定する必要がある場合は、それぞれの項目の正常域、異常域が異なっており、抗体の濃度、量を変化させるといったことが必要とされるケースに特に有利である。

5

10

15

20

25



## 請 求 の 範 囲

1. 液体試料中に存在する 1 種類以上の分析物の量を測定あるいは有無を検定する分析方法であって、

5 (1) 第一配位子にマーカが結合されてなる 1 種類以上のマーカ標識化配位子を含み、且つ第二配位子に分析物の種類に応じて予め決定された塩基配列を有する核酸である結合子が結合されてなる 1 種類以上の結合子標識化配位子を含む試薬と、

10 1 種類以上の分析物を含む液体試料を接触させて、特定の種類の分析物、該分析物に対して特異的に結合する特定の種類のマーカ標識化配位子、及び該分析物に対して特異的に結合する特定の種類の結合子標識化配位子からなる特定の種類の複合体を 1 種類以上形成させること、

15 (2) 形成された 1 種類以上の複合体を、シート状の展開要素中に毛管現象により展開させること、

(3) 前記複合体中の結合子に対して相補的な塩基配列を有する核酸からなる抗結合子が種類毎に独立して前記展開要素上に固定されてなる検出ゾーンにおいて、前記結合子と前記抗結合子間の相補的結合により分析物の種類毎に前記複合体を捕獲して各々独立した  
20 帯を形成させること、

(4) 前記検出ゾーンで形成された帯に含まれるマーカを測定又は検定することを含むこと、  
からなる分析方法。

25 2. 液体試料中に存在する 1 種類以上の分析物の量を測定あるいは有無を検定する分析方法であって、

(1) 1 種類以上の分析物を含む液体試料をシート状の展開要素

に適用して、展開要素中を毛管現象により展開させること、

5 (2) 分析物の特定の種類に対して特異的に反応することができる第一配位子にマーカが結合されてなる1種類以上のマーカ標識化配位子、及び分析物の特定の種類に対して特異的に反応することが  
5 5 できる第二配位子に分析物の種類に応じて予め決定された塩基配列を有する核酸である結合子が結合されてなる1種類以上の結合子標識化配位子を含む試薬成分が封入されている封入ゾーンに前記液体試料を移動させ接触させること、

10 (3) 前記試薬と液体試料との接触により形成された、特定の種類の分析物、該分析物に対して特異的に結合する特定の種類のマー  
10 10 カー標識化配位子、及び該分析物に対して特異的に結合する特定の種類の結合子標識化配位子からなる特定の種類の複合体の1種類以上、或いは形成されつつある反応物を毛管現象により該展開要素中に展開させること、

15 (4) 前記複合体中の結合子に対して相補的な塩基配列を有する核酸からなる抗結合子が種類毎に独立して前記展開要素上に固定されてなる検出ゾーンにおいて、前記結合子と前記抗結合子間の相補  
15 15 的結合により分析物の種類毎に形成された前記複合体を捕獲して各々独立した帯を形成させること、

20 (5) 前記検出ゾーンで形成された帯に含まれるマーカを測定又は検定することを含むこと、  
20 20 からなる分析方法。

3. 分析物を測定又は検定するときの検出感度のコントロールは  
25 25 結合子と抗結合子を構成する互いの核酸の塩基配列の相補的な一致率をコントロールすることによって行う請求項1又は2記載の分析方法。

4. 前記第一配位子及び第二配位子が免疫化学的活性物質である請求項 1 又は 2 記載の分析方法。

5 5. 前記第一配位子と第二配位子が同一の反応性を有する物質である請求項 1 又は 2 記載の分析方法。

6. 前記第一配位子と第二配位子が異なる反応性を有する物質である請求項 1 又は 2 記載の分析方法。

10

7. 前記第一配位子及び第二配位子が核酸であり、

該第一配位子が分析物としての核酸と少なくとも相補的に結合できる塩基配列を有し、

15 該第二配位子が分析物としての核酸と少なくとも相補的に結合できる塩基配列を有することを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の分析方法。

8. 前記展開要素上に固定されている抗結合子の固定手段は、抗結合子の 5' 末端、3' 末端又は該抗結合子を構成する核酸の塩基  
20 に導入された官能基を介して、展開要素としての不溶性支持体の官能基と共有結合させたものである請求項 1 又は 2 記載の分析方法。

9. 前記展開要素上に固定されている抗結合子の固定手段は、抗結合子の 5' 末端或いは 3' 末端に導入されたビオチン又は該抗結合子を構成する核酸の塩基に導入されたビオチンを介して、展開要素としての不溶性支持体に予め固定させたアビジン又はストレプト  
25 アビジンと結合させたものである請求項 1 又は 2 記載の分析方法。

10. 前記展開要素上に固定されている抗結合子の固定手段は、  
抗結合子の 5' 末端、3' 末端又は該抗結合子を構成する核酸の塩  
基に導入された官能基を介してタンパク質と結合されてなる核酸結  
5 合タンパク質を、展開要素としての不溶性支持体に結合させたもの  
である請求項 1 又は 2 記載の分析方法。

11. 前記核酸結合タンパク質は、核酸を牛血清アルブミンに結  
合させたものである請求項 10 記載の分析方法。

10

12. 前記核酸結合タンパク質は、核酸を免疫グロブリンに結合  
させたものである請求項 10 記載の分析方法。

13. 前記タンパク質は、分析物に対して免疫化学的活性を有す  
15 るものである請求項 10 又は 12 記載の分析方法。

14. 前記マーカが金属コロイド、着色ラテックス及び着色リ  
ポソームから選ばれたものである請求項 1 又は 2 記載の分析方法。

20 15. 試料中に存在する 1 種類以上の分析物の量の測定或いは有  
無を検定するための分析キットであって、該キットは、試薬、及び  
該試薬とは別体の分析装置から構成され、

前記試薬は、分析物の特定の種類に対して特異的に反応すること  
ができる第一配位子にマーカが結合されてなる 1 種類以上のマー  
25 カー標識化配位子、及び分析物の特定の種類に対して特異的に反応  
することができる第二配位子に分析物の種類に応じて予め決定され  
た塩基配列を有する核酸からなる結合子が結合されてなる 1 種類以

上の結合子標識化配位子を含む試薬であり、

前記分析装置は、シート状の展開要素を有し、該展開要素は毛管現象により、分析物、試薬、及び分析物と試薬の結合物を展開でき、前記別体の試薬に含まれる結合子に対して相補的な塩基配列を有する核酸からなる1種類以上の抗結合子が、種類毎に独立して該展開要素の検出ゾーンに固定されてなるものであり、該検出ゾーンにおいて、該結合子との核酸の相補的結合により分析物の種類毎に複合体を捕獲して各々独立した帯を形成させることができる分析キット。

10

16. 請求項15記載の診断キットに使用される分析装置。

17. 試料中に存在する1種類以上の分析物の量の測定或いは有無を検定するための分析装置であって、該装置は、

15

(1) 毛管現象により、分析物、試薬、及び分析物と試薬の結合物を展開できるシート状の展開要素、

20

(2) 前記シート状の展開要素の一端に位置し、液体試料を外部から受入れ可能で、受入れた液体試料を他方端に達するのに十分な供給能力を持ち、後記する試薬が封入された封入ゾーンに対して分析すべき液体試料を供給することが可能で、該液体試料を外部から受け入れるための適用ゾーン、

25

(3) 分析物の特定の種類に対して特異的に反応することができる第一配位子にマーカーが結合されてなる1種類以上のマーカー標識化配位子、及び分析物の特定の種類に対して特異的に反応することができる第二配位子に分析物の種類に応じて予め決定された塩基配列を有する核酸からなる結合子が結合されてなる1種類以上の結合子標識化配位子を含む試薬が含まれている前記展開要素の前記適

用ゾーンに近い位置に配置された封入ゾーン、

(4) 前記展開要素中を拡散してきた分析物、試薬、及び分析物と試薬の結合物を受け入れることができ、且つ前記適用ゾーンとは離れた位置に配置された吸水ゾーン、

5 (5) 前記封入ゾーンと前記吸水ゾーンとの間に位置し、前記結合子に対して相補的な塩基配列を有する抗結合子が1種類以上独立して固定されており、分析物の種類毎にマーカー標識化配位子、分析物、及び結合子標識化配位子から形成された複合体を捕捉して検出できる検出ゾーン、

10 を含む分析装置。

18. 前記第一配位子及び第二配位子が免疫化学的活性物質である請求項16又は17記載の分析装置。

15 19. 前記第一配位子及び第二配位子が同一の反応性を有する物質である請求項16又は17記載の分析装置。

20. 前記第一配位子及び第二配位子が異なる反応性を有する物質である請求項16又は17記載の分析装置。

20

21. 前記第一配位子及び第二配位子が核酸であり、

該第一配位子が分析物としての核酸と少なくとも相補的に結合できる塩基配列を有し、

25 該第二配位子が分析物としての核酸と少なくとも相補的に結合できる塩基配列を有することを特徴とする請求項16又は17記載の分析装置。

2 2. 前記展開要素上に固定されている抗結合子の固定手段は、  
抗結合子の 5' 末端、3' 末端又は該抗結合子を構成する核酸の塩  
基に導入された官能基を介して、展開要素としての不溶性支持体の  
官能基と共有結合させたものである請求項 1 6 又は 1 7 記載の分析  
5 装置。

2 3. 前記展開要素上に固定されている抗結合子の固定手段は、  
抗結合子の 5' 末端或いは 3' 末端に導入されたビオチン又は該抗  
結合子を構成する核酸の塩基に導入されたビオチンを介して、展開  
10 要素としての不溶性支持体に予め固定させたアビジン又はストレプト  
アビジンと結合させたものである請求項 1 6 又は 1 7 記載の分析  
装置。

2 4. 前記展開要素上に固定されている抗結合子の固定手段は、  
15 抗結合子の 5' 末端、3' 末端又は該抗結合子を構成する核酸の塩  
基に導入された官能基を介してタンパク質と結合されてなる核酸結  
合タンパク質を、展開要素としての不溶性支持体に結合させたもの  
である請求項 1 6 又は 1 7 記載の分析装置。

20 2 5. 前記核酸結合タンパク質は、核酸を牛血清アルブミンに結  
合させたものである請求項 2 4 記載の分析装置。

2 6. 前記核酸結合タンパク質は、核酸を免疫グロブリンに結合  
させたものである請求項 2 4 記載の分析装置。

25 2 7. 前記タンパク質は、分析物に対して免疫化学的活性を有す  
るものである請求項 2 4 又は 2 6 記載の分析装置。

28. 前記マーカが金属コロイド、着色ラテックス及び着色リ  
ポソームから選ばれたものである請求項16又は17記載の分析装  
置。

5 29. 請求項16又は17記載の分析装置が不透湿性固体材料か  
らなるケース中に配置されている分析装置。

10

15

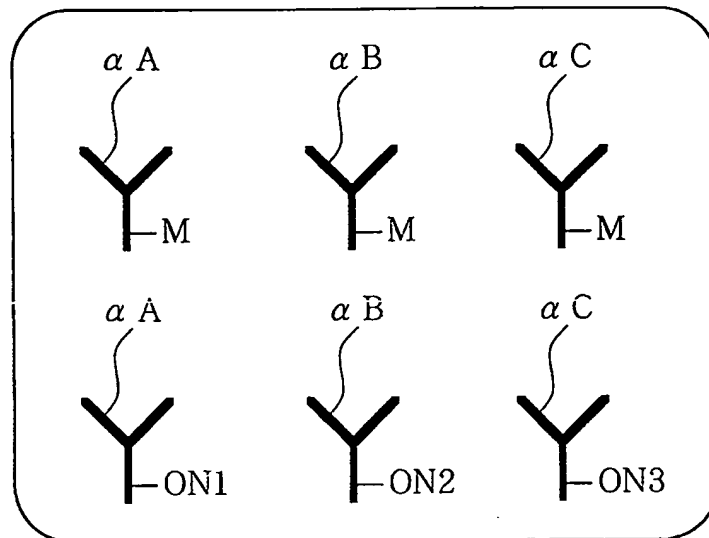
20

25



## 第 1 図

抗原 A、B、C が同時に検出可能な一種類以上の抗原分析試薬



$\alpha A, \alpha B, \alpha C$  : 抗原 A,B,C に対する各々の抗体

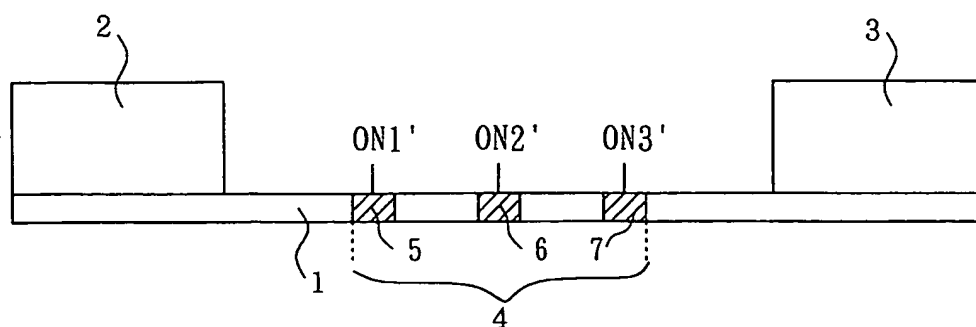
ON1 : ON2, ON3 とは異なる配列を持つ  
オリゴヌクレオチド

ON2 : ON1, ON3 とは異なる配列を持つ  
オリゴヌクレオチド

ON3 : ON1, ON2 とは異なる配列を持つ  
オリゴヌクレオチド

M : マーカー

## 第 2 図

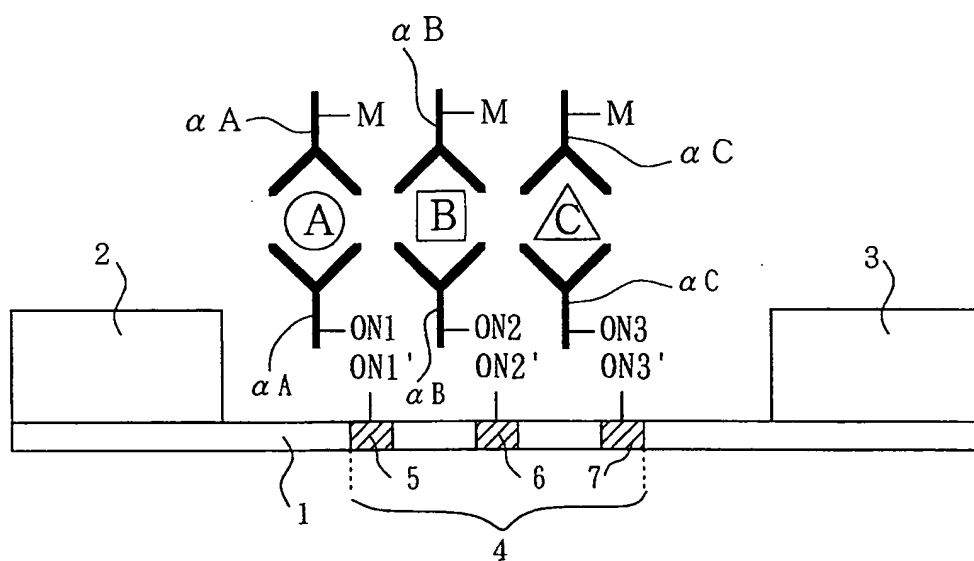


ON1' : ON1 に相補的塩基配列を持つオリゴヌクレオチド

ON2' : ON2 に相補的塩基配列を持つオリゴヌクレオチド

ON3' : ON3 に相補的塩基配列を持つオリゴヌクレオチド

## 第 3 図

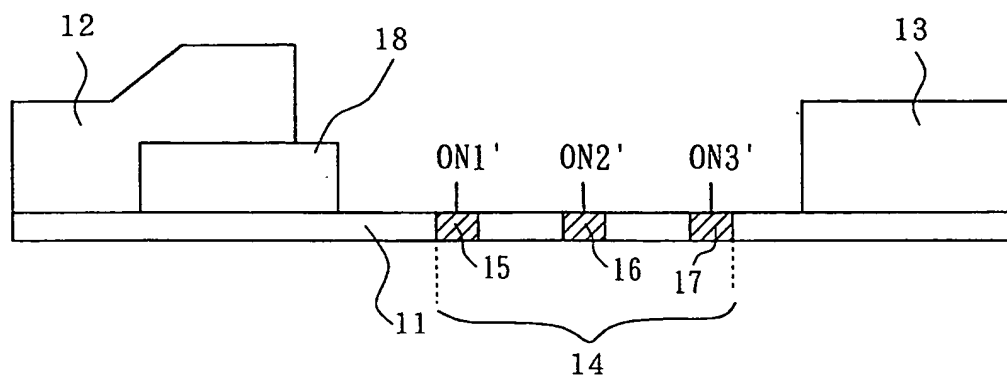


Ⓐ : 抗原 A

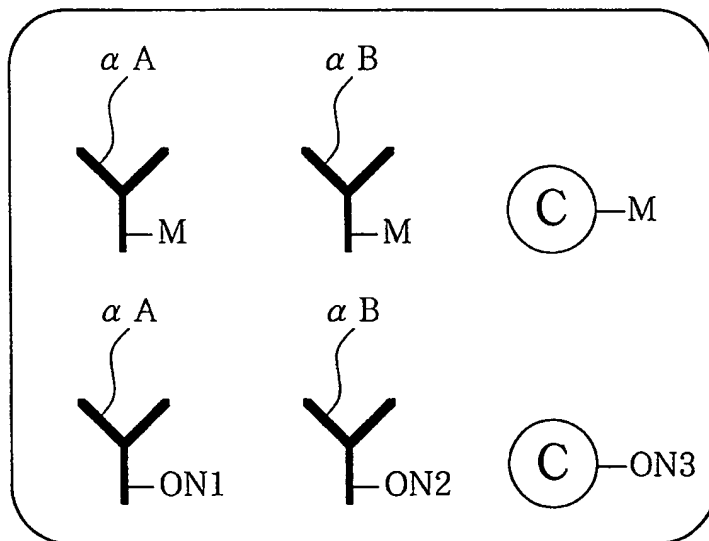
Ⓑ : 抗原 B

Ⓒ : 抗原 C

第 4 図



第 5 図



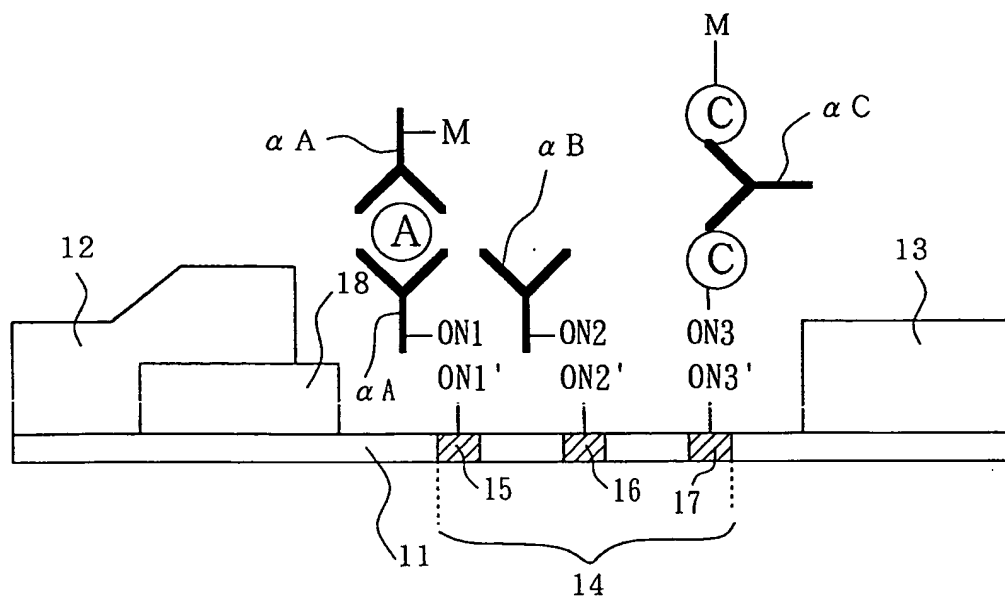
$\alpha A, \alpha B$  : 図1と同じ

ON1, ON2, ON3 : と同じ

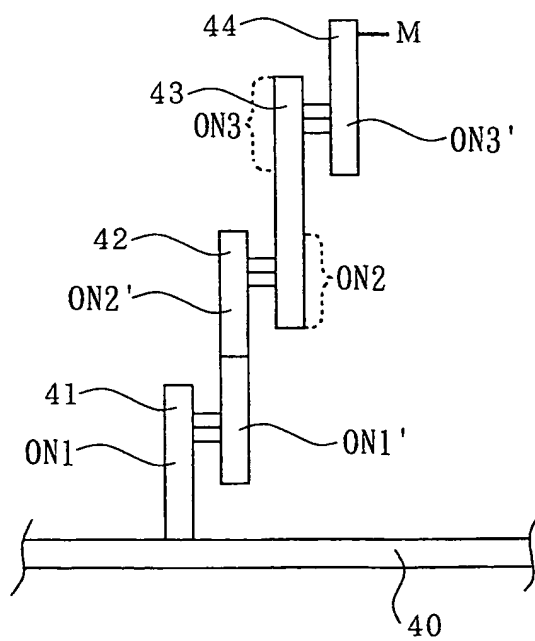
M : 図1と同じ

⊙ : 抗原C

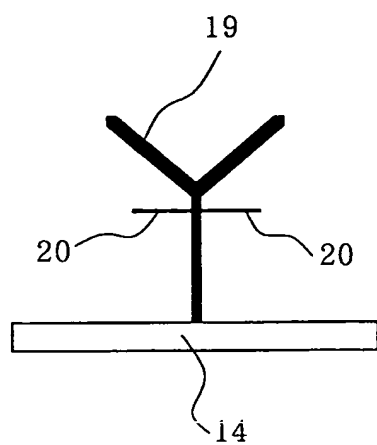
第 6 図



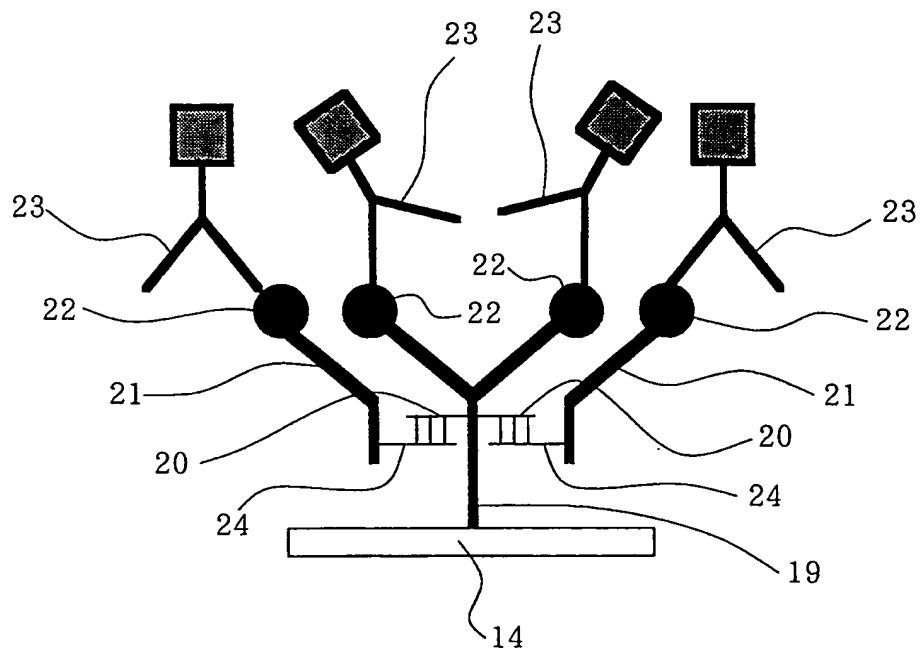
第 7 図



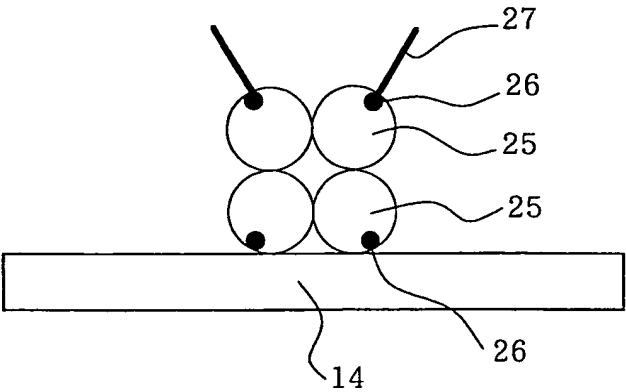
第 8 図



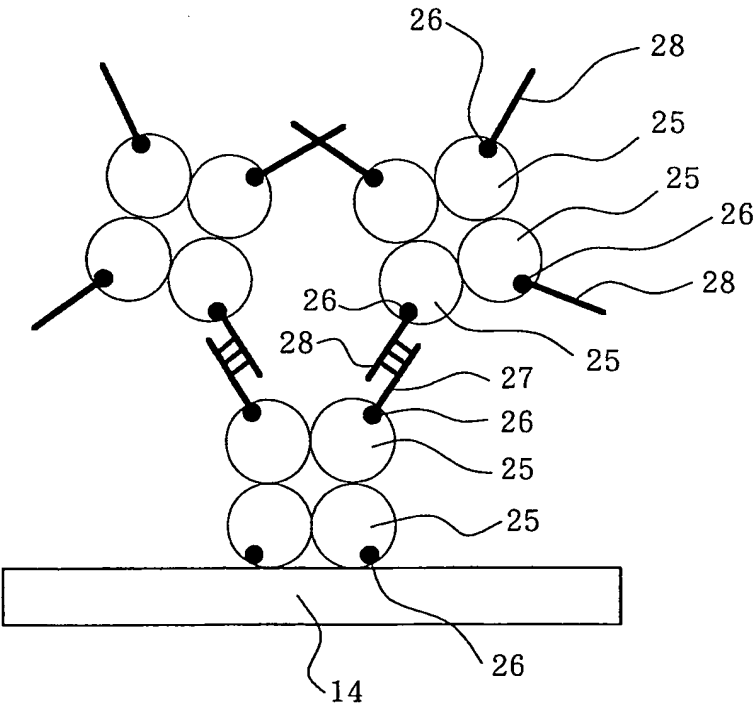
第 9 図



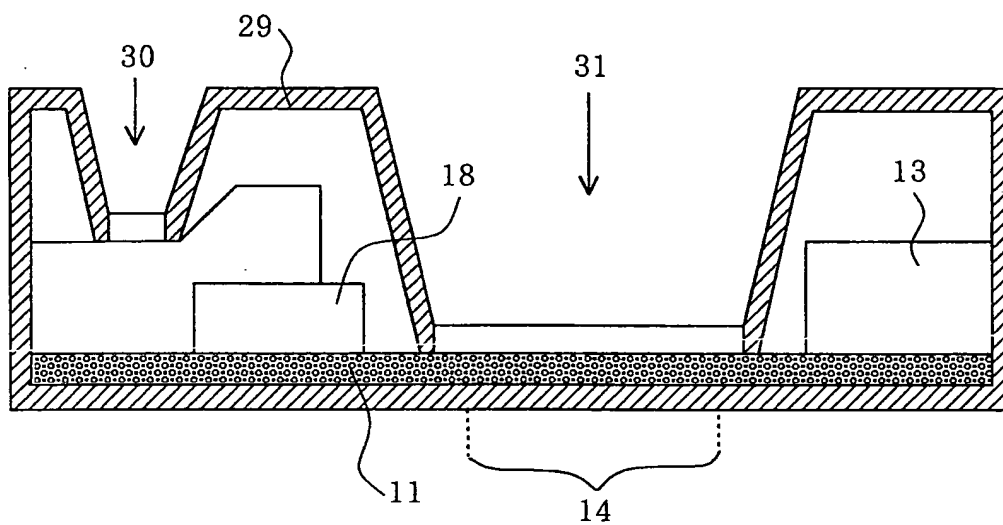
第 1 0 図



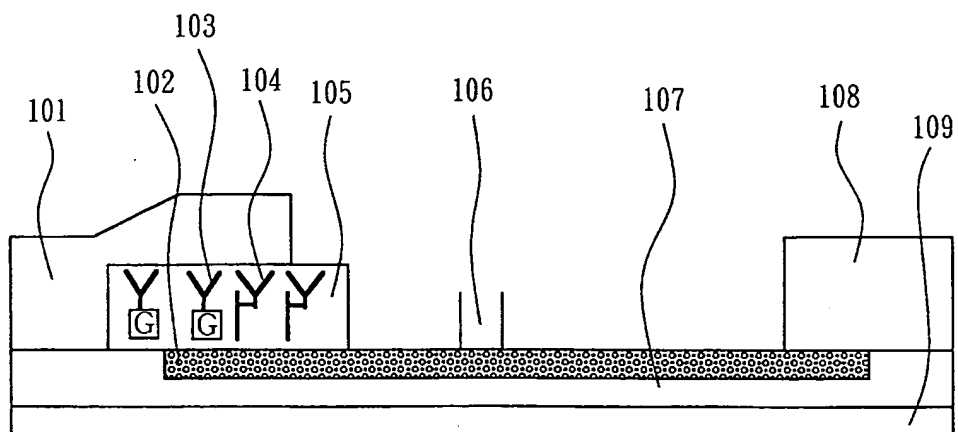
第 1 1 図



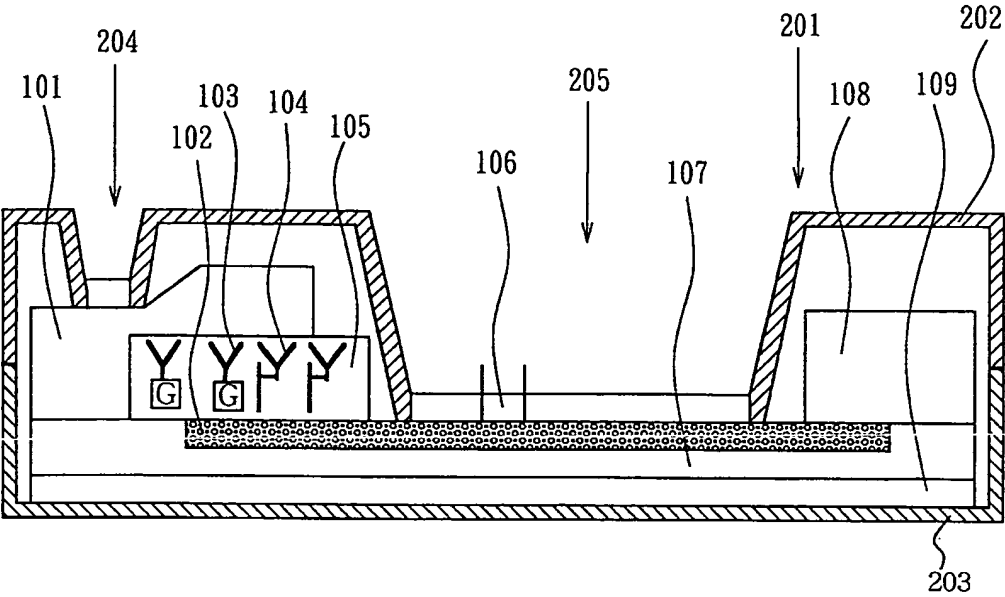
第 1 2 図



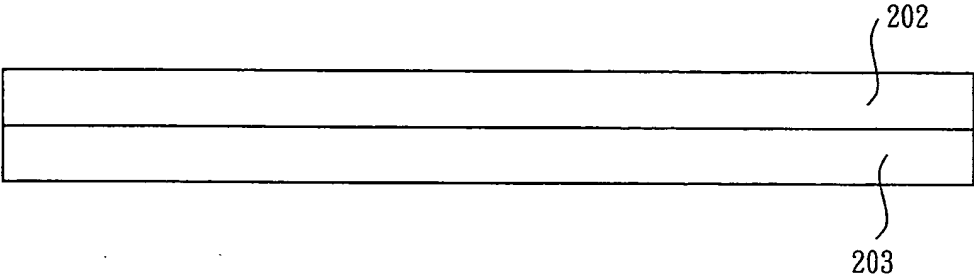
第 1 3 図



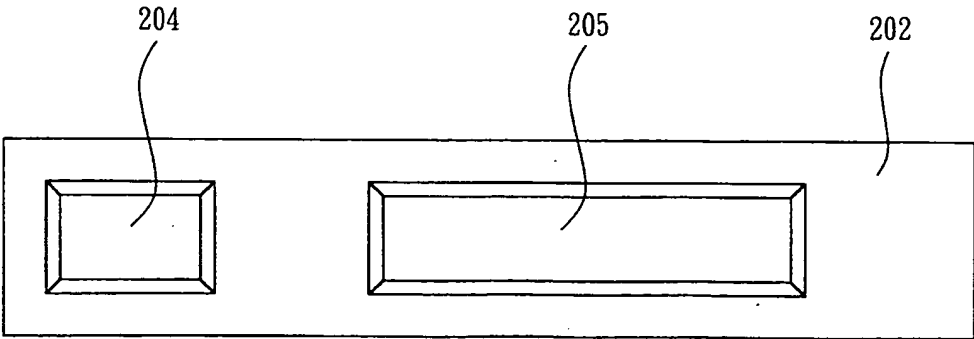
第 1 4 図



第 1 5 図



第 1 6 図





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00857

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.C1<sup>6</sup> G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.C1<sup>6</sup> G01N33/543

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1940-1998 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1998

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1998

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 8-94618, A (Wakamoto Pharmaceutical Co., Ltd.), April 12, 1996 (12. 04. 96) (Family: none)	1-29
Y	JP, 6-186232, A (Sanyo Chemical Industries, Ltd.), July 8, 1994 (08. 07. 94) (Family: none)	1-29
Y	WO, 94/27150, A1 (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), November 24, 1994 (24. 11. 94) & EP, 698792, A	1-29

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
May 6, 1998 (06. 05. 98)Date of mailing of the international search report  
May 19, 1998 (19. 05. 98)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl <sup>8</sup> G01N33/543		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl <sup>8</sup> G01N33/543		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1940-1998年 日本国公開実用新案公報 1971-1998年 日本国登録実用新案公報 1994-1998年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 8-94618, A (わかもと製薬株式会社) 12. 4月. 1996 (12. 04. 96) (ファミリーなし)	1~29
Y	JP, 6-186232, A (三洋化成工業株式会社) 8. 7月. 1994 (08. 07. 94) (ファミリーなし)	1~29
Y	WO, 94/27150, A1 (日水製薬株式会社) 24. 11月. 1994 (24. 11. 94) & EP, 698792, A	1~29
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 06. 05. 98	国際調査報告の発送日 19.05.98	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 亀田 宏之 印	2J 9015
電話番号 03-3581-1101 内線 3252		